

**MTA Doktora Pályázat**  
**Doktori Értekezés**

**A pikkelysömör pathomechanizmusáról**

**Dr. Bata Zsuzsanna**

**SZEGED**

**2005**

## Tartalomjegyzék

1. A dolgozatban előforduló rövidítések jegyzéke .....	3
2. Bevezetés .....	4
3. Célkitűzések .....	11
4. Anyagok és Módszerek .....	13
4.1. Szövetminták .....	13
4.2. Szövetfestés .....	13
4.3. Immuncitokémia .....	14
4.4. Epidermális sejtszuspenzió készítése .....	14
4.5. Dermális sejtszuspenzió készítése .....	15
4.6. Sejttenyésztés T sejtek analíziséhez .....	15
4.7. Felnőtt humán bőrből származó epidermális sejtek tenyésztése .....	15
4.8. HaCaT sejtek tenyésztése .....	16
4.9. HaCaT sejtek szinkronizálása .....	17
4.10. Áramlásos citometriás vizsgálatok .....	18
4.11. Perifériás vér sejtjeinek immunfestése .....	19
4.12. RT-PCR .....	19
4.13. Quantitatív (real-time) RT-PCR (Q-RT-PCR) .....	21
4.14. Immunoblot .....	21
5. Eredmények .....	22
6. Megbeszélés .....	60
7. Összefoglalás .....	79
8. A munka gyakorlati hasznosításának lehetősége .....	81
9. Az értekezés témájához kapcsolódó saját közlemények: .....	83
10. A doktori értekezésben felhasznált eredményeket tartalmazó munkák: .....	83
11. Irodalom .....	86
12. Köszönetnyilvánítás .....	99

## 1. A dolgozatban előforduló rövidítések jegyzéke

PCNA:	proliferálódó sejt nukleáris antigén
K1/K10:	keratin 1/ keratin 10
$\gamma$ IFN:	interferon gamma
IL-3:	interleukin 3
GM-CSF:	granulocita makrofág kolónia stimuláló faktor
KGFR:	keratinocita növekedési faktor
FBS:	fötális borjúsérum
PBS:	foszfát puffer
PMA:	forbol mirisztát acetát
DNS:	deoxiribonukleinsav
RNS:	ribonukleinsav
KBM:	keratinocita bazális médium
EGF:	epidermális növekedési faktor
EDTA:	etiléndiamintetraacetátsav
BrDU:	5-bromo-2'-deoxi-uridin
IL-1 $\alpha$ :	interleukin 1 alfa
IL-1 $\beta$ :	interleukin 1 béta
IL-1 RA:	interleukin1 receptor antagonista
PCR:	polimeráz láncreakció
FN:	fibronektin
DEJ:	dermo-epidermális junkció
MMP:	mátrix metalloproteináz
TIMP:	tissue inhibitor of MMP
STAT:	signal transducer and activator of transcription
TGF- $\beta$ :	transzformáló növekedési faktor béta
JAK:	Janus tirozin kináz
Cdk:	ciklin dependens kináz
IL-8:	interleukin 8
GRO- $\alpha$ :	growth related oncogene alfa
TNF- $\alpha$ :	tumor nekrosis faktor alfa
LFA:	leukocita funkció asszociált antigén

## 2. Bevezetés

A disszertációban a pikkelysömör betegség pathomechanizmusában résztvevő különböző folyamatokat vizsgáló munkákat foglalom össze. Bár részletesebben azokról az eredményekről számolok be, melyek a Ph.D. értekezésem megvédése (1997. február) után születtek, a munka folyamatos jellegéből következően, az érthetőség kedvéért a korábbi munkák eredményeire is hivatkozom.

A pikkelysömör (Psoriasis) egy poligénesen öröklődő bőrbetegség, melynek prevalenciája 2-3 % körül van különböző populációkban, a bőrbetegségek közül ez a leggyakoribb. Más poligénus betegségekhez hasonlóan a betegség klinikai spektruma széles, az életminőséget alig befolyásoló néhány lokalizált bőrtünet jelentkezésétől, a súlyos, egész bőrfelületet érintő, ízületi panaszokkal kísért, az életet veszélyeztető formáig terjed. A klinikai megjelenés prototípusa a plakkos forma (Psoriasis vulgaris). Az elsősorban nagy ízületeket érintő gyulladás (Arthropathia psoriatica) kivételével a betegség kizárólag a bőrt és annak függelékszerveit érinti.

A pikkelysömörös bőrlézió klasszikus elváltozása a dominálón T sejtes infiltrátum jelenléte a hám alatti kötőszövetben és a hámban, valamint a hámsejtek (keratinociták) fokozott osztódása és kóros differenciálódása (1. ábra). Polimorfonukleáris granulociták infiltrátumai úgynevezett Munro-féle microabszcessusokat képeznek a hám (epidermisz) felső rétegében, melyek dominanciája a psoriasis pustulosa klinikai megjelenését eredményezi.

A pikkelysömörös betegek bőrén a legkülönbözőbb hatásokra (fizikai-, kémiai trauma, infekció, kontakt allergének, stressz, fokozott alkoholfogyasztás, bizonyos gyógyszerek) kialakul a jellegzetes pikkelysömörös lézió (Köbner jelenség), jelezve, hogy a pikkelysömörös beteg bőre tünetmentes állapotában is kóros reakciókészséget hordoz.

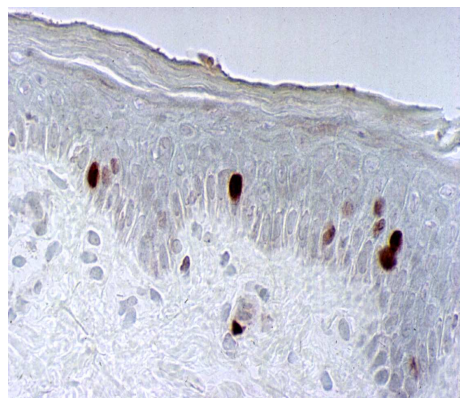
A klinikai variánsok között megkülönböztethetjük a fiatal korban jelentkező (I. típus) és a felnőtt korban jelentkező (II. típus) formáját a betegségnek. A fiatal korban jelentkező forma általában 40 éves kor előtt alakul ki, gyakran generalizált, hirtelen, nagy kiterjedésben jelentkező guttált psoriasis klinikai képe látható. A psoriasis guttata klinikai képére kevésbé a nagyobb méretű

plakkok, inkább a kisebb, papulosus bőrelváltozás a jellemző. A fiatalok csoportban gyakrabban előforduló eruptív, kiterjedt guttált psoriasis kialakulásában valószínűleg szerepet játszanak bakteriális infekciók, a bakteriális szuperantigének nem specifikus módon aktiválják azokat az immunfolyamatokat, melyek a betegség pathomechanizmusában lényeges szerepet játszanak (Prinz, 1999).

**A**



**B**



**C**



1. ábra A felső képen (A) a pikkelysömör jellegzetes vörös, felszínén ezüstösen hámló, jól körülhatárolt elváltozása látható. A két alsó képen a normál bőr (B) és a pikkelysömörös lézió (C) szövettani képe látható. Fagyasztott metszeten immunhisztokémiai eljárással Ki67 ellenanyaggal vannak jelölve a hám osztódó sejtjei (barna pontok). Az egészséges hámszövethez képest jelentősen megnövekedett a proliferatív sejtek száma a pikkelysömörös lézióban. Az epidermisz kiszélesedett, a hám papillái megnyúltak a hámsejtek fokozott osztódása és kóros differenciálódása következtében.

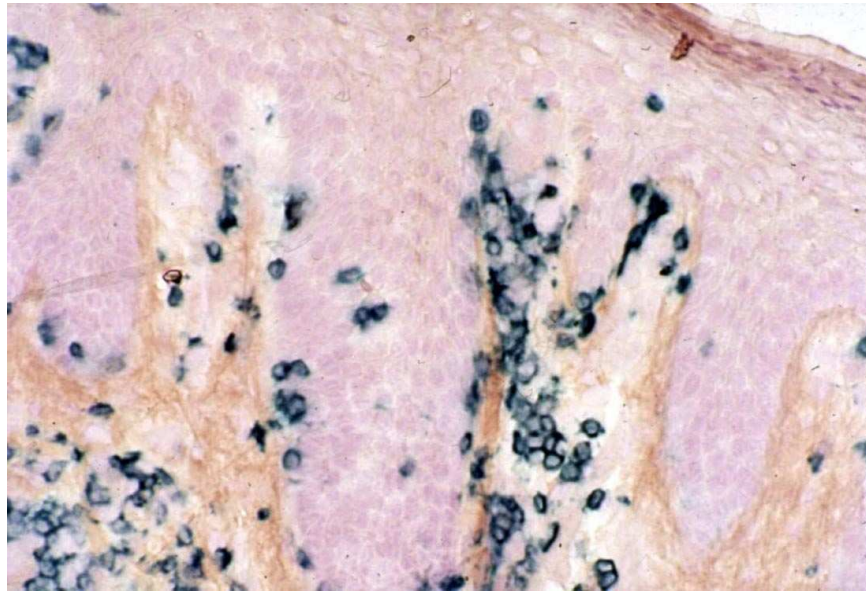
A fiatalkori formában a betegek majdnem 90%-ában találtak HLA Cw6 asszociációt, ez az arány a felnőtt korban, általában 50-60 éves kor körül, jelentkező formában csak 50% kaukázusi beteganyagon (Henseler and Christophers, 1995). A HLA asszociáció etnikai variabilitást mutat, japán pikkelysömörös betegek 26%-a Cw6 pozitív csak, viszont 17%-uk hordozza a Cw7 antigént (Asahina és mtsai., 1996). Különböző populációkban kapcsoltsági analízis vizsgálatokkal eddig 8 különböző kromoszómán azonosítottak psoriasisra hajlamosító géneket, ebből 3-at más, független populációkban is sikerült azonosítani (Elder és mtsai., 2001).

A HLA asszociáció pathomechanizmusban játszott szerepe nem ismert, elképzelhető, hogy a HLA Cw6 csak marker gén és a 6-os kromoszómán a HLA régióban elhelyezkedő más kapcsolt gének, mint például a corneodesmosin, mely a hámsejtek differenciálódása során jelenik meg a sejtekben, játszanak szerepet a betegségre való hajlam kialakításában (Allen és mtsai., 1999; Zhou and Chaplin, 1993).

A bőrt infiltráló T sejtek pathomechanizmusban játszott szerepének vizsgálata az 1980-as években kezdődött, Bos és munkatársai 1983-ban írták le az infiltrátum sejtjeinek immunfenotípusát (2. ábra) (Bos és mtsai., 1983). Valdimarsson munkatársaival 1986-ban közölte azt a feltételezést, hogy a hámsejtek fokozott osztódásáért a T sejtek lehetnek felelősek a betegségben (Valdimarsson és mtsai., 1986).

Már 1990-ben megjelent közleményekben beszámoltak arról, hogy allogénikus csontvelőtranszplantációval a betegség átvihető, illetve gyógyítható (Eedy és mtsai., 1990; Gardembas-Pain és mtsai., 1990). Hasonló megfigyelésekről az utóbbi években is beszámoltak csontvelőtranszplantált egyéneken (Kanamori és mtsai., 2002 ; Snowden and Heaton, 1997).

1991-ben jelent meg az a dolgozat, melyben nagy beteganyagon végzett, dupla-vak vizsgálattal bizonyították a cyclosporin jó terápiás hatását a betegségben (Ellis és mtsai., 1986). A cyclosporin a calcineurin foszfataz gátlása révén a T sejtek aktivációját gátolja. Az aktivált calcineurin felelős az aktivált T sejtek citoplazmikus nukleáris faktorának (NFAT) defoszforilálásáért, mely defoszforilált állapotban a sejtmagba transzlokálódik, és ott transzkripciót aktivációt eredményez.



2. ábra A pikkelysömörös léziót infiltráló CD3<sup>+</sup> sejtek immunhisztokémiai preparátumon

Calcium-dependens reguláció számos citokin (IL-2,  $\gamma$ IFN, IL-4, TGF), valamint az IL-2 receptor szabályozásában érvényesül (Rao és mtsai., 1997). Ezek az adatok indirekt módon támogatták a T sejtek pathomechanizmusban játszott szerepének fontosságát.

A 70-es évek elejéig az epidermisz osztódni képes bazális sejtrétegét (stratum germinativum) homogén sejtpopulációnak tekintették, melyben a sejtek azonos eséllyel osztódnak, majd differenciálódnak (Leblond és mtsai., 1964). A későbbi vizsgálatok során kiderült, hogy a hámsejtek jellegzetes oszlopos elrendeződést mutatnak, ezen oszlopok alján ritkán osztódó sejtek (keratinocita őssejtek, stem), felette közvetlenül gyors egymásutánban osztódó sejtek (átmeneti osztódó sejtek, transiently amplifying, TAC), majd efelett nem osztódó sejtek helyezkednek el. A hám proliferatív kapacitással bíró sejtjeinek populációja tehát nem homogén.

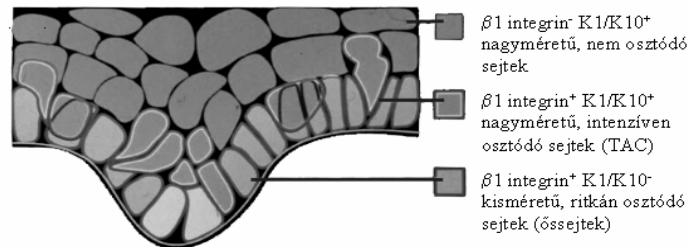
A pikkelysömörben észlelhető fokozott hámsejt proliferáció jelenségének pontosabb megismerése érdekében a 90-es évek elején multiparaméteres áramlások citometriás vizsgálatokkal karakterizáltuk a hámszövet proliferatív populációit

normál bőrben, ami lehetővé tette annak felismerését, hogy a pikkelysömörös lézió kórosan osztódó sejtjei az egyébként normál bőrben alig-alig osztódó keratinocita őssejtek (Bata-Csörgő és mtsai., 1993). A normál epidermiszből frissen szeparált osztódó hámsejteken a  $\beta 1$  integrin és a keratin 1/10 kifejeződést vizsgálva megállapítottuk, hogy minden proliferálódó hámsejtre jellemző a  $\beta 1$  integrin kifejeződése, ezen belül a keratin 1/10 (K1/K10) kifejeződés alapján a sejteket két csoportra lehet osztani. A hámiban bazálisan elhelyezkedő, K1/K10-et nem kifejező sejtek jellemzően kisméretűek, egyszerű a citoplazmájuk és alacsony az osztódási rátájuk, vagyis a sejtek többsége normál bőrben sejtnyugalmi (quiescent) állapotban van, nem fejezik ki a proliferálódó sejt nukleáris antigént (PCNA) sem. Mindezek az őssejtpopulációk jellemző tulajdonságai. A K1/K10 pozitív sejtek citoplazmája granuláltabb, nagyobb a sejtek mérete és igen magas az osztódási rátájuk, ami az átmeneti osztódó sejtpopulációra jellemző. A  $\beta 1$  integrint már nem kifejező, K1/K10<sup>+</sup> hámsejtek nem osztódó, terminálisan differenciálódott sejtek (3. ábra).

A pikkelysömörös léziós bőrben a  $\beta 1$  integrin és K1/K10 kifejeződés alapján ugyanazt a három sejtpopulációt lehet elkülöníteni, mint a normál bőrben. A különbség a  $\beta 1$  integrin<sup>+</sup> K1/K10<sup>-</sup> sejtek populációjában található, ezek a sejtek a normál bőrtől eltérően a pikkelysömörös lézióban igen magas rátával osztódnak és PCNA pozitívak.

Azt a feltételezést, hogy a pikkelysömörös lézióban található T sejtek befolyásolják a hámsejtek proliferációját igazolták azok a kísérletek, melyekben a léziós bőrből klónozott, *in vitro* aktivált T sejt klónok felülűszojának hatását vizsgáltuk *in vitro* tenyésztett normál és tünetmentes pikkelysömörös bőrből származó hámsejtek növekedésére (Bata-Csörgő és mtsai., 1995).





3. ábra Az interfollikuláris hámszövet sejtjeinek karakterizálása a sejtek  $\beta 1$  integrin és a keratin 1/10 kifejeződése és proliferációja alapján

Voltak olyan T sejt klónok, melyek felülűszói jelentősen serkentették, voltak olyanok, melyek nem befolyásolták és voltak olyanok, melyek gátolták a hámsejt kolóniák növekedését. A növekedést gátló felülűszók  $CD8^+(\alpha\beta^+)$  T sejtekből, míg a többi  $CD4^+$  T sejtekből származott. A hámsejtek *in vitro* növekedését fokozó T sejt felülűszók limfokin profiljára jellemző volt a magas  $\gamma IFN$  és GM-CSF és közepes mértékű IL-3 tartalom. Mivel a hosszabb *in vitro* tenyésztés a tenyésztett sejtek tulajdonságait megváltoztatja és mivel tudtuk, hogy a pikkelysömörben mutatkozó hiperproliferáció lényege az, hogy az egyébként sejtnyugalmi állapotban lévő őssejtípusú hámsejtek proliferálnak, a T sejt hatások vizsgálatára egy olyan modellt kerestünk, melyben a  $\beta 1$  integrin<sup>+</sup> K1/K10<sup>-</sup> hámsejtek sejtciklusba való indukcióját vizsgálhatjuk. Áramlásos citometriás analízis során kiderült, hogy bizonyos tenyésztési körülmények között a tenyészetbe frissen lerakott hámsejtek közül a  $\beta 1$  integrin<sup>+</sup> K1/K10<sup>-</sup> sejt kezd osztódni, ez az a sejtípus, ami hosszabb távon az *in vitro* kolóniákat megalapozza, a többi sejt viszonylag rövid idő alatt kihal a tenyészetből, anélkül, hogy *in vitro*

növekedne. Tehát a primér *in vitro* hámsejtenyészet első pár napjában a keratinocita őssejtek sejtciklus indukciója következik be. A sejtciklus indukció mértékét a tenyészetben megjelenő a  $\beta 1$  integrint erősen kifejező, PCNA pozitív sejtpopuláció nagyságával, illetve e sejtpopuláció sejtciklus analízisével (DNS festést alkalmazva) mérni lehet. Ezt követően teszteltük az egyik hámsejt kolónia növekedést okozó, *in vitro* aktivált  $CD4^+$  T sejt klón felülúszójának hatását normál és pikkelysömörös tünetmentes bőrből származó hámsejteken. A felülúszó szignifikánsan megnövelte a tünetmentes pikkelysömörös keratinocita őssejtek sejtciklusba való indukcióját, ezzel ellentétben a normál bőrből származó sejteken nem láttunk hatást. Neutralizáló hatású monoklonális ellenanyagokat adva a T sejt felülúszóhoz azt is láttuk, hogy a  $\gamma$ INF gátlásával meg lehet akadályozni ezt a sejtnövekedést indukáló hatást, ugyanakkor a  $\gamma$ IFN egyedül nem volt képes a sejtek sejtciklus indukcióját növelni, ez a hatása csak a másik két limfokin jelenlétében érvényesült. Ezek a vizsgálatok nemcsak azt bizonyították, hogy az aktivált T sejtek szolubilis faktoraikkal valóban képesek a pikkelysömörös hámsejt hiperproliferációt előidézni, hanem azt is, hogy a pikkelysömörös tünetmentes bőrből származó hámsejtek különböznek a normál bőrből származó sejtektől az aktivált  $CD4^+$  T sejt felülúszókra való reakció készségükben.

### 3. Célkitűzések

3.1. Az extracelluláris mátrix szerepének vizsgálata a pikkelysömörös tünetmentes hámsejt T sejt limfokinekre adott hiperproliferatív válaszában

3.1.1. A normál és a pikkelysömörös tünetmentes epidermisz fibronectin kifejeződésének vizsgálata.

3.1.2. Az  $\alpha 5$  integrin kifejeződés összehasonlítása pikkelysömörös tünetmentes és normál bőrben.

3.1.3. A pikkelysömörös tünetmentes keratinocita hiperproliferatív válaszát kiváltó limfokin környezet rekombináns limfokinekkal való pontos meghatározása.

3.1.4. A fibronectin és a T sejt limfokinek együttes hatásának vizsgálata a pikkelysömörös összejt típusú keratinocita sejtciklus indukciójára.

3.1.5. Megvizsgálni, hogy a fibronectin a sejtek fokozottabb sejtciklus indukcióját a sejtek adhéziójának fokozásával fejt-e ki?

3.1.6. Megvizsgálni, hogy van-e az adhéziótól független direkt sejtciklust szabályozó hatása az  $\alpha 5$  integrinnek a humán keratinocitákon?

3.1.7. A hámsejtek onkofötális, EDA<sup>+</sup> fibronectin termelésének vizsgálata.

3.1.8. A normál és pikkelysömörös tünetmentes keratinociták EDA<sup>+</sup> fibronectin termelésének összehasonlítása.

3.2. A sejtproliferáció és differenciálódás vizsgálata HaCaT keratinocitákon

3.2.1. A proliferáció/differenciálódás és az  $\alpha 5$  integrin, keratin 1 és 10 kifejeződés kapcsolatának vizsgálata HaCaT keratinocitákon.

3.2.2. Az  $\alpha 5$  integrin, keratin 1 és keratin 10 mRNS szintű szérumban általi szabályozásának vizsgálata.

3.2.3. Az  $\alpha 5$  integrin sejtciklust szabályozó szerepének vizsgálata HaCaT sejteken.

### 3.3. A T sejtek vizsgálata pikkelysömörben

3.3.1. A pikkelysömörös léziós bőrt *in vivo* infiltráló T sejtek limfokin profiljának vizsgálata.

3.3.2. A CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> NK T sejtek vizsgálata pikkelysömörös betegek és egészséges egyének perifériás vérében.

3.4. Az IL-1 sejtszintű kifejeződésének vizsgálata pikkelysömörös léziós és normál hámsejtekben, a proliferatív sejtek populációiban, valamint a sejtciklus különböző fázisaiban levő sejteken.

3.5. 3.5.1.-3.5.2. Az etanol és acetone hatásának vizsgálata a hámsejtek növekedésére, valamint a sejtek  $\alpha 5$  integrin, ciklin D1 és keratinocita növekedési faktor receptor (KGFR) mRNS szintű kifejeződésére.

3.6. 3.6.1-3.6.3. Az immunszuppresszív hatású rapamycin (sirolimus) hatásának vizsgálata a keratinociták proliferációjára.

## 4. Anyagok és Módszerek

### 4.1. Szövetminták

A kísérletekben felhasznált pikkelysömörös és normál bőrminták betegek, illetve egészséges egyének által önként adományozott, általában a farpofa területéről vett vékony félvastag bőrből (keratóma biopsziák) származtak. Néhány esetben punch biopsziás minták vétele is történt. A betegek megfelelő felvilágosítás után beleegyeztek a bőr önkéntes adományozásába kísérletes célból. Az önkéntes bőrminták vételének körülményei megfelelően szabályozottak voltak és az aktuális Intézetek Etikai Bizottságainak engedélyével történtek. A vizsgálatokban felhasznált normál keratinociták egy része plasztikai sebészeti műtétek során eldobásra kerülő szövetekből származott.

A perifériás vér vizsgálatához az Intézmények Etikai Bizottsága által engedélyezett módon betegek és egészséges egyének önkéntesen adtak vért.

### 4.2. Szövetfestés

A punch biopsziás mintákat OCT-ben (Tissue Tec II; Miles Laboratories, Inc, Elkhart, IN, USA) fagyasztottuk, majd kriosztat segítségével metszettük. A fagyasztott metszeteket acetonban fixáltuk és a szövetet anti-humán plazma fibronektin ellenes ellenanyaggal (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) festettük. Kontrollként nyúl IgG-t alkalmaztunk az ellenanyaggal azonos koncentrációban (Endogen Inc., Boston, MA, USA). A metszeteket szobahőn 1 óráig inkubáltuk nedves kamrában az elsődleges ellenanyaggal, majd PBS mosást követően a második ellenanyaggal, mely FITC-tal jelölt nyúl IgG ellenes antitest volt (Caltag Laboratories, Inc., San Francisco, CA, USA). Ezt követően a szövetet immunfluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

A normál és pikkelysömörös tünetes szövetminta D1 ciklinnel való festéséhez a fagyasztott metszeteket 2 % paraformaldehidben fixáltuk, majd a sejteket egy éjszakán keresztül 4°C-on inkubáltuk a monoklonális anti-humán D1 ciklin ellenanyaggal (Pharmingen, San Diego, CA, USA) 1:100 hígítás, 50 mM Tris-HCL (pH 7,4) 150 mM NaCl és 0,1% triton-x 100, valamint 0,5 % bovin

szérum albumint tartalmazó festőoldatban (Sigma). Az ellenanyag jelöléséhez avidin-biotin-immunperoxidáz rendszert használtunk (Vectastain Elite kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), 3-amino-9-etilkarbazol (AEC, Sigma) szolgált kromogén szubsztrátként.

#### 4.3. Immuncitokémia

Tenyésztett fibroblasztokat és keratinocitákat (mindkettő 3. passzázsban), valamint HaCaT sejteket tárgylemezt tartalmazó tenyésztőflaskákba tettünk ( $4 \times 10^4$  sejt/cm<sup>2</sup>), majd pár napig a sejteknek megfelelő médiumokban tenyésztettük őket (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), amíg majdnem konfluensekké váltak. Ezt követően a flaskából kiemeltük a tárgylemezt és a sejteket 20 percig 4°C-on 2% paraformaldehidben (Sigma) fixáltuk. 1 µg/ml koncentrációjú egérben készült, az EDA<sup>+</sup> fibronektinre specifikus monoklonális ellenanyaggal (ICN Biochemicals Inc., Aurora, OH, USA) 4°C-on egy éjszakán át nedves kamrában inkubáltuk a sejteket. Izotipikus kontrollként egér IgG1 (Sigma, Budapest, Magyarország) hasonló koncentrációjú oldata szolgált. Az ellenanyag jelöléséhez avidin-biotin-immunperoxidáz rendszert használtunk (Vectastain Elite kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), 3-amino-9-etilkarbazol (AEC, Sigma) szolgált kromogén szubsztrátként.

#### 4.4. Epidermális sejtszuspenzió készítése

A keratóma biopsziákat diszpázban (Collaborative Biomedical Products, Bedford, USA, Roshe Molecular Biochemicals, Mannheim, Németország) egy éjszakán keresztül 4°C-on tartottuk, mely lehetővé tette az epidermisről a vékony dermisz leválasztását egy csipesszel. Az epidermiszt ezt követően 0,25 %-os tripszinben (USB Biologicals, Cleveland, OH, USA, Sigma, Budapest) inkubáltuk 37 °C-on 30 percig, majd 0,01% DNáz (Sigma) jelenlétében a sejteket disszociáltuk. A tripszin hatását melegítéssel inaktivált főtális borjúsérum (FBS; Hyclone, Logan, UT, USA) hozzáadásával semlegesítettük. A kísérletekhez használt borjúsérum minden esetben melegítéssel inaktivált volt. A sejteket sejtszűrő membránon (100 µm, nylon háló, BioDesign, Camel, NY, USA) átszűrtük, majd Ca-, Mg-mentes PBS-ben vagy Hank féle oldatban mostuk. Az élő

sejtek számát a sejtszuspenzióban tripán kék festéssel hemocitóméterben történő számolással határoztuk meg.

#### 4.5. Dermális sejtszuspenzió készítése

A diszpáz emésztést követően a bőrmintáról leválasztott dermiszt 2-3 órán keresztül 15 ml RPMI 1640 (Gibco) médiumban 40,5 mg kollagenáz, 18,75 mg hialuronidáz 0,01% DNáz, 0,01% szódium-piruvát és 0,01% Hepes puffer (Sigma) jelenlétében 37 °C-on inkubáltuk. Ezt követően a sejteket sejtszűrő membránon átszűrtük, Hank féle 1% FBS-t tartalmazó izotóniás sóoldatba.

#### 4.6. Sejttenyésztés T sejtek analíziséhez

Az epidermisz és a dermisz sejteit 12-14 órán keresztül 37°C-on,  $10^6$  sejt/ml L-glutaminnal, penicillin/streptomycin/fungizonnal kiegészített RPMI 1640 (Gibco) médiumban 10% humán AB szérum (NORMLCERA-Plus, NABI, Miami, FL, USA) jelenlétében tenyésztettük. A tenyésztés utolsó 4 órájában a sejtekhez 2,5 ng/ml PMA-t és 1mMol ionomycint adtunk, valamint 10 µg/ml Brefeldint, hogy a citokinek Golgin keresztüli transzportját blokkoljuk (Picker és mtsai., 1995).

#### 4.7. Felnőtt humán bőrből származó epidermális sejtek tenyésztése

A felnőtt humán bőrből készített epidermális sejteket keratinocita bazális médiumban (KBM, illetve keratinocita SFM médium epidermális növekedési faktor (EGF) és borjú agyalapi mirigy kivonat (BPE) kiegészítés nélkül) (Gibco Brl, Gaitersburg, MD, USA, Eggstein, Németország) 1 % FBS jelenlétében tenyésztettük különböző ideig. A médiumot L-glutaminnal, penicillin, streptomycin és fungizon oldatokkal (Sigma) egészítettük ki.

A sejtek tenyésztése 6 lyukú tenyésztőedényben történt,  $1 \times 10^6$  sejt/ml sejtszuspenzióból 2 ml került minden lyukba. A sejtek felvétele a tenyészetből pár perces 0,025% tripszin+0,01% EDTA (Sigma) expozíció után történt.

Az extracelluláris fibronectin hatás vizsgálatához a tenyésztőedényekre 20 µg/ml végkoncentrációjú borjú fibronectint (Sigma) tettünk, majd 4°C-on tartottuk az edényeket egy éjszakán át. Foszfát puffer (PBS) mosást követően tettük a bevont edényekre a sejteket.

A limfokin hatások vizsgálatához a sejtek tenyésztőedénybe helyezését követően 2 órával adtuk a különböző rekombináns limfokineket a tenyészetekhez, IL-3 (0,3 ng/ml), GM-CSF (1 ng/ml) és γIFN (100 U/ml) (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA, USA).

Az α5 integrin sejttapadástól független sejtciklusra való hatását vizsgálándó a 20 µg/ml fibronectinnel bevont sejttenyésztő edényre lerakott sejtekhez 24 órával a tenyésztés kezdetét követően 25 µg/ml végkoncentrációjú neutralizáló hatású, Na-azid mentes anti-α5 integrin monoklonális ellenanyagot (IIA1 klón, Pharmingen) és ugyanilyen koncentrációban Na-azid mentes egér IgG1-et (Pharmingen) adtunk.

A tenyésztett sejteket különböző idejű tenyésztési periódust követően, általában 3-4 nap, vizsgáltuk áramlásos citometriás analízissel. A korai tenyészetekben a médiumot nem cseréltük a sejteken, így a tenyészetek zárt rendszert képeztek.

A hámsejt kolóniák nagyságát hosszabb idejű, általában 10-14 napos tenyésztés utáni tenyészetekben, 15 perces 1% formalinos fixálást követően alkalmazott 50% Nílus kék és 50% rhodamin B (Sigma) festéssel határoztuk meg.

A rövid idejű kultúrákhoz a sejttenyésztés elindítását követő 2 óra múlva tettük a 20 nM rapamycint (Wyeth-Ayerst, Philadelphia, PA, USA), a rapamycin abszolút etanolban volt feloldva, ezért a kontroll kultúrákba a megfelelő mennyiségű abszolút etanol került. Ezt követően a sejteket rapamycin jelenlétében tenyésztettük 3 napig. A rapamycin citotoxikus hatását tripán kék festéssel hemocitóméterben vizsgáltuk a sejtek tenyészetből való felvételét követően.

#### 4.8. HaCaT sejtek tenyésztése

A HaCaT sejtek Fusening Professzor laboratóriumából (Heidelberg, Németország) származnak. Fusening és munkacsoportja állította elő ezt az immortalizált keratinocita sejtvonalat egy melanoma malignumban szenvedő beteg



ép bőrből (Boukamp és mtsai., 1988). A laboratórium szerte a világban ingyen rendelkezésére bocsátja minden kutatónak a sejtvonalat. A HaCaT sejteket magas cukortartalmú Dulbecco által modifikált Eagle médiumban 10% FBS jelenlétében tenyésztettük (high glucose DMEM; Gibco, Eggstein, Németország).

#### 4.9. HaCaT sejtek szinkronizálása

Miután a sejtek 100%-ban benőtték a tenyésztőedényt, teljesen konfluens állapotban tartottuk őket 5 napig, majd a 10% FBS-t tartalmazó tenyésztőfolyadékot FBS mentes médiumra cseréltük. A szérumentes környezetben egy hétig tenyésztettük a sejteket, ezt követően ismét 10% FBS-t tartalmazó tenyésztő közegbe passzáltuk őket. A HaCaT sejteket a passzáláshoz 0,025 tripszin+0,01% EDTA kezelés segítségével vettük fel a tenyészetekből. A sejtek passzálása 75 cm<sup>2</sup>-es tenyésztő flaskákba 5x10<sup>3</sup> sejt/cm<sup>2</sup> sejtdenzitással történt a szinkronizálást követően.

A HaCaT sejtek BrdU inkorporációjának méréséhez szemi-konfluens tenyészetből felvett sejteket 1x10<sup>4</sup> sejt/lyuk mennyiségben 96 lyukú tenyésztőedényekben növesztettünk. Amikor a sejtek félig benőtték a 96 lyukú edényeket, 30 percig különböző koncentrációjú etanol (2,14 mM-1,71 M) és aceton (1,7 mM-1,36 M) DMEM+0.5% FBS kezelésnek tettük ki őket. Az etanol kezelést követően 48, az aceton kezelést követően 24 órával a sejtekhez 10 µM végkoncentrációban BrdU-t adtunk. A sejteket további 4 órán át inkubáltuk, majd az inkorporált BrdU mennyiségét enzimatikus immunoszorbens esszével határoztuk meg a gyártó előírásának megfelelően (Roche, Mannheim, Németország) spektrofotométer segítségével.

A HaCaT sejtek α5 integrinjének gátlásához a sejtek letapadását követően, 6 órával a passzálás után, a sejtkörnyezethez 25 µg/ml végkoncentrációjú neutralizáló hatású, Na-azid mentes anti-α5 monoklonális ellenanyagot (IIA1 klón, Pharmingen) adtunk. Az izotipikus kontroll tenyészetekhez ugyanilyen koncentrációban Na-azid mentes egér IgG1-et (Pharmingen) adtunk.

A HaCaT keratinocita α5 integrin és keratin1/10 kifejeződésének szérum általi szabályozásának vizsgálatához félig konfluens sejteket szérumot tartalmazó médiumba passzáltunk, majd 12 óra múlva a médiumot szérumentes médiummal

cseréltük ki. Ezt követően különböző időpontokban néztük a sejtek mRNS szintű  $\alpha 5$  integrin és K1K10 kifejeződését.

#### 4.10. Áramlásos citometriás vizsgálatok

A frissen szeparált vagy tenyészetből felvett epidermális sejteket az  $\alpha 5$  integrinnel való jelöléshez 1% formalinban 15 percig jégén fixáltuk, a  $\beta 1$  integrin, K1/K10, PCNA, ciklin D1, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RA, PI és EDA<sup>+</sup> fibronectin jelölésekhez pedig -20°C-os 70%-os etanolban egy éjszakán át -20°C-on. Az EDA<sup>+</sup> fibronectinnel való sejtjelölés legerősebb akkor volt, ha a fent leírt etanol fixálást a sejtek 0,4% paraformaldehid fixálása előzte meg. Az etanol kezelés megnyitja a sejtmembránt, ezért a sejtek intracelluláris anyagait is jelölhetjük ilyen fixálást követően.

A bőrt infiltráló limfociták sejtfelszíni markereit a rövid ideig tenyésztett natív sejteken megfestettük, majd a sejteket 4% paraformaldehiddel fixáltuk, a citokinek intracelluláris jelöléséhez a sejtmembránt 0,1%-os saponint (Sigma) tartalmazó PBS+1% borjú szérum albumin oldattal nyitottuk meg.

A sejtek jelöléséhez a következő monoklonális ellenanyagokat használtuk: anti- $\beta 1$  integrin (4B4, Coulter Immunology, Hialeah, FL, USA) 1:20 hígítás, anti-PCNA (PC10, Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN, USA) 1:100 hígítás, anti-ciklin D1 (Pharmlingen, San Diego, CA, USA) 1:100 hígítás, anti-keratin 1/keratin 10 (ICN Pharmaceuticals Inc., Costa Mesa, CA, USA) 1:50 hígítás, anti- $\alpha 2$  integrin (CD49b, Pharmlingen) 1:100 hígítás, anti- $\alpha 3$  integrin (CD49c, Pharmlingen) 1:20 hígítás, anti- $\alpha 5$  integrin (CD49e, Pharmlingen) 1:50 hígítás, anti-EDA<sup>+</sup> fibronectin (ICN Biochemicals Inc., Aurora, OH, USA) 1:100 hígítás, anti-CD3 (Pharmlingen), anti-CD3-PE (DAKO, Koppenhága, Dánia), anti-CD56-FITC (NKH1 klón, Serotec, Oxford, Anglia), anti-IFN $\gamma$ -FITC (Pharmlingen) és anti-IL-4-PE (Pharmlingen), anti-IL-1 $\alpha$  (A8 klón, Upjohn, Kalamazoo, MI, USA), anti-IL-1RA (I4 klón, Upjohn), anti-IL-1 $\beta$  (8516.3 klón, R&D Systems, Minneapolis, MT, USA), az IL-1 ellenes ellenanyagok mindegyikének 33  $\mu$ g/ml volt a végkoncentrációja.

A fenti monoklonális ellenanyagok egérben készültek, ezért izotipikus kontrollként a megfelelő izotípusú egér IgG-t használtuk, a monoklonális ellenanyag koncentrációkkal azonos koncentrációban (egér IgG1, egér IgG2a, Sigma). Második ellenanyagként FITC vagy PE jelölt anti-egér izospecifikus immunglobulinok szolgáltak (anti-egér IgG1FITC, anti-egér IgG2aPE vagy IgG2aFITC, Boehringer Mannheim Biochemicals). A direkt konjugált citokin jelölésekhez direkt konjugált izotípus kontrollokat alkalmaztunk. A sejteket 30 percig szobahőn, 1 óráig jégen vagy a ciklin D1 esetében 4°C-on egy éjszakán át inkubáltuk a primér ellenanyagokkal, a második ellenanyaggal való inkubálás 30 percig szobahőn vagy jégen történt.

A sejtek összfehérje tartalmát fluoreszcein izotiocianáttal (FITC, Sigma) határoztuk meg. Az etanolban fixált sejtek DNS festése 50 µg/ml propidium iodid és 100 U RNAze A (Sigma) oldattal történt szobahőn 30 percig.

Az immunjelöléseket, valamint a DNS festést követő sejtanálízis Epics Elite (Coulter Corp., Hialeah, FL), Facscalibur és Facscan (Becton Dickinson, Heidelberg, Németország) áramlásos citométerekkel történt. Az adatokat Elite programmal (Coulter Corporation), CellQuest programmal (Becton Dickinson) és Modfit programmal (Verity Software House, Topsham, ME, USA) analizáltuk.

#### 4.11. Perifériás vér sejtjeinek immunfestése

Vért EDTA tartalmú csövekbe vettünk, majd a vvt-eket FACS Lysing (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) oldattal lizáltuk. A sejteket szobahőn, 20 percig inkubáltuk sötétben a direkt konjugált monoklonális ellenanyagokkal, majd a jelölt sejteket 2% paraformaldehiddel fixáltuk az áramlásos citometriás analízis elvégzése előtt.

#### 4.12. RT-PCR

A sejtekből az RNS kivonása TRIzolal (Gibco) a gyári protokoll szerint történt. A cDNA szintézise 0,5 µg teljes RNS-ből 20 µl végtérfogatban történt First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas, Vilnius, Litvánia) alkalmazásával. A reverz transzkripció utáni PCR amplifikáció az MBI Fermentas

Taq DNS polimeráz és dNTP kit segítségével történt. Az RT oldatok a következő mennyiségben szolgáltak templátként az egyes specifikus PCR reakciókban: az  $\alpha 5$  integrinhez 10  $\mu$ l vagy 2  $\mu$ l, a K/K10-hez 0,5  $\mu$ l, a ciklin D1-hez 2  $\mu$ l, a KGFR-hez 2  $\mu$ l, a  $\beta$ -aktinhez 1  $\mu$ l vagy 2  $\mu$ l. A  $\beta$ -aktin szolgált belső kontrollként. A  $MgCl_2$  koncentrációja minden reakcióban 1,5 mM volt.

A következő primereket használtuk, a primerek koncentrációja 0,66 pmol/  $\mu$ l volt minden reakcióban:

$\beta$ -aktin: 5'-AGA GAT GGC CAC GGC TGC TT-3' és 5'-ATT TGC GGT GGA CGA TGG AG-3'

KGFR: 5'-AGT TTA AGC AGG AGC ATC GCA TT-3' és 5'-CTG TTA CCA CCA TAC AGG CGA TTA A-3'

Ciklin D1: 5'-AGG AGA ACA AAC AGA TCA-3' és 5'-TAG GAC AGG AAG TTG TTG-3'

$\alpha 5$  integrin: 5'-ATT ATC AGA GCA AGA GCC GGA TAG-3' és 5'-GGA GAT GAG GGA CTG TAA ACC GA-3'

keratin 1: 5'-GGA CAT GGT GGA GGA TTA CCG-3' és 5'-TGC TCT TTC TGG GCT ATA TCC TCG-3'

keratin 10: 5'-GCA AAA TCA AGG AGC GGT ATG A-3' és 5'-GAG CTG CAC ACA GTA GCG ACC-3'.

Az egyes PCR reakciók körülményei megegyeztek, 94°C 60 sec, 60°C 60 sec, 72°C 60 sec a ciklusszámok a következők voltak:

$\beta$ -aktin: 25 ciklus, KGFR: 30 ciklus, ciklin D1: 25 vagy 35 ciklus,  $\alpha 5$  integrin: 25 vagy 30 ciklus, keratin 1 és keratin 10: 27 ciklus.

A PCR reakció anyagait 2%-os agaróz gélen megfuttattuk, etidium bromiddal festettük, lefényképeztük és az eredményt denzitométerrel analizáltuk a Kodak Edas 290 denzitométer és a Kodak 1D Digital Science program segítségével (Scientific Imaging Systems, New Haven, CT, USA).

#### 4.13. Quantitatív (real-time) RT-PCR (Q-RT-PCR)

Az  $\alpha 5$  integrin hatás neutralizáló monoklonális ellenanyaggal történt blokkolása után a sejtekben a ciklin D1 mRNS mennyiségét Q-RT-PCR reakcióval határoztuk meg. A reakcióban SYBR-green (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) szolgált a DNS jelölésére, a reakcióban használt D1 specifikus primer-pár a következő volt: ciklin D1: 5' GAG CCC CAA CAA CTT CTT 3' és 5' CCT CCT CCT CCT CTT CCT 3'. 18S rRNS: 5'-CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA-3' és 5'-GCT GGA ATT ACC ACC GCG GCT-3'. A 18S rRNS szolgált belső kontrollként. A Q-RT-PCR reakciót iQ Supermix (BioRad, Hercules, CA, USA) használatával iCyclerrel (BioRad) végeztük.

#### 4.14. Immunoblot

A sejtekből 1,5%-os nátrium-dodecil-szulfát (SDS)+ 62,5 mM Tris-HCl, pH: 6,8, 5 mM EDTA + 5% 2 merkaptotanol + 1  $\mu$ g/ml antipain+ 1  $\mu$ g/ml kimosztatin és 1  $\mu$ g/ml leupeptin lizáló oldattal kivontuk a fehérjét. A lizátumot lecentrifugáltuk, majd  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A fehérjét denaturáló körülmények között gélelektroforézissel szeparáltuk (SDS/PAGE 9%-os gél), majd nitrocellulóz membránra vittük (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). A felvitt fehérjemennyiségek azonosságát a gél és a membrán coomassie kék festésével (Sigma) ellenőriztük. A membránt 2 órán keresztül szobahőn 0,05% Tween 20 (Sigma) és 3% zsírtalanított tejport (Fluka Chemie, Neu Buchs, Svájc) tartalmazó Tris oldatban (150 mM NaCl, 25 mM Tris, pH: 7,4) tartottuk, hogy a nem specifikus kötéseket blokkoljuk. Ezt követően a membránt a megfelelő monoklonális ellenanyagokkal egy éjszakán keresztül  $4^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk.

A következő ellenanyagokat használtuk: egér monoklonális  $\alpha 5$  integrin ellenes ellenanyag (Transduction Laboratories, klón 1) 1:250-es hígításban, egér monoklonális keratin1/keratin10 ellenes ellenanyag (ICN, Biomedicals, AE2 klón) 1:500-as hígításban. Alkalikus foszfátázzal konjugált egér ellenes IgG-t használtunk második ellenanyagként (Sigma) 1:2500-as hígításban. A blottok előhívása 5-bromo-4-kloro-3-indolil foszfátáz/nitroblue tetrazólium szubsztráttal történt (BCIP/NBT, Sigma).

## 5. Eredmények

### 5.1.1. A normál bőrtől eltérően a tünetmentes pikkelysömörös bőrben fibronectin található a bazális keratinociták környezetében

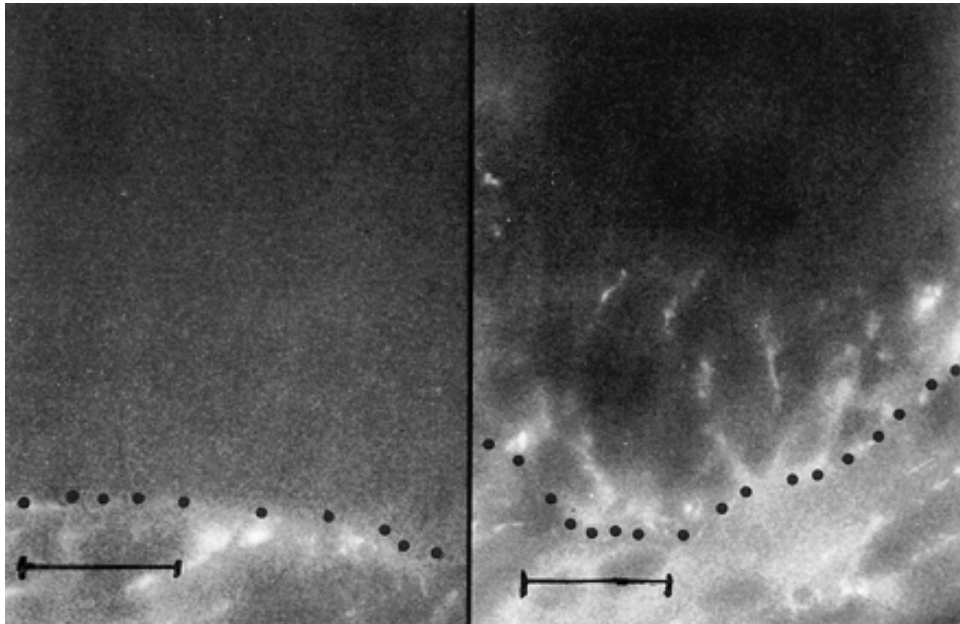
A normál valamint a pikkelysömörös tünetmentes keratinocita össejtek limfokinek adott eltérő sejtproliferációs válaszána a korai in vitro tenyésztben állhat a sejtek genetikusan determinált tulajdonsága, de az is elképzelhető, hogy a sejtek olyan környezeti hatásoknak vannak folyamatosan kitéve *in vivo*, mely ezt a kóros reakciókészséget eredményezi. Ismert, hogy a szolubilis mitogének mellett (növekedési faktorok, limfokinek) az adhézio-függő sejtek növekedését az extracelluláris mátrix is befolyásolja.

Normál bőrben a bazális sejtek környezetében nem található fibronectin, sebzés során azonban a sejtek környezete fibronectinben gazdaggá válik, ilyenkor a keratinociták aktiválódásának egyik első jele a fibronectin fő receptorának kifejezése ( $\alpha 5 \beta 1$  integrin). Transzgenikus egerekben a szuprabazális  $\alpha 2$ ,  $\alpha 5$  és  $\beta 1$  integrin forszírozott kifejezése az egérbőr pikkelysömörre emlékeztető fenotípusát idézi elő (Carroll és mtsai., 1995).

A pikkelysömörös léziós bőrben régen leírták, hogy a bazális membrán strukturálisan sérült, herniációk észlelhetők a léziós területen (Pinkus és Mehregan, 1966). 1992-ben egy olasz munkacsoport közölte, hogy nem csak a léziós pikkelysömörös bőrben, hanem a tünetmentes bőrben is eltér bizonyos, köztük az  $\alpha 5$  integrin molekulák kifejeződési mintázata a normál bőrhöz viszonyítva (Pellegrini és mtsai., 1992). Míg normál bőrben az  $\alpha 5$  integrin gyengén fejeződik ki és diffúzan oszlik el a sejtmembránon, addig a pikkelysömörös bőrben erősebb a kifejeződés és az elrendeződés fokális tömörülést mutat.

Ezek alapján feltételeztük, hogy egy lehetséges sejt-környezeti faktor, mely a tünetmentes pikkelysömörös keratinociták limfokin választát befolyásolja a sejtek környezetében jelenlevő fibronectin lehet, mely a nem teljesen intakt bazális membránon keresztül juthat be az epidermisz bazális rétegébe. Tünetmentes pikkelysömörös és normál bőrt fagyasztott metszeteken FITC-cel jelölt plazma fibronectin specifikus anti-humán fibronectin ellenanyaggal festettünk és valóban

észleltük, hogy míg a normál bőrben csak a dermisz és a bazális membrán területe festődött, addig a tünetmentes pikkelysömörös bőrben a fluoreszcens jelölés a bazális hámsejtek környékén az epidermiszben is észlelhető volt (4. ábra).



#### 4. ábra

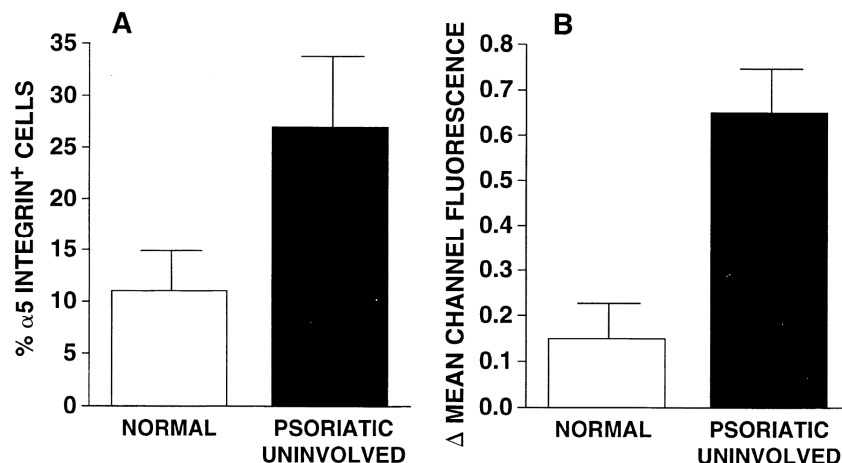
A bal oldalon a pikkelysömörös tünetmentes, a jobb oldalon a normál bőr plazma fibronectin ellenes ellenanyaggal jelölt képe látható. A normál bőrben csak az epidermiszben látszik jelölés, a pikkelysömörös tünetmentes bőrben a jelölés a dermo-epidermális junkció (pötyökkel jelölve) felé is terjed, jelezve, hogy a plazma fibronectin a bazális keratinociták közvetlen környezetében is megtalálható. A vonal 20  $\mu\text{m}$ -es.

5.1.2. A pikkelysömörös tünetmentes bőr sejtjei a normál bőr sejtjeihez képest jóval erősebben kifejezik az  $\alpha 5$  integrint

Mivel az extracelluláris fibronectinről ismert, hogy fő receptorának az  $\alpha 5\beta 1$  integrinnek a kifejeződését fokozhatja a sejtekben, áramlásos citometriás analízissel megvizsgáltuk a frissen szeparált pikkelysömörös tünetmentes, tünetes és a normál bőrsejtek  $\alpha 5$  integrin expresszióját. Az  $\alpha 5$  integrin mellett összehasonlítottuk a hámsejtek által ismertén kifejezett  $\alpha 2$  és  $\alpha 3$  integrin kifejeződést is a tünetmentes pikkelysömörös és normál bőrben. Ez utóbbi két integrin nagyjából azonos arányú kifejeződését találtuk, viszont az  $\alpha 5$  integrin kifejeződése jóval kifejezettebb volt a tünetmentes pikkelysömörös bőrben, mint a normál bőrben. A sejtek  $27\pm 7\%$ -a bizonyult pozitívnak a tünetmentes szeparátumban (10 betegen vizsgálva), míg a normál mintákban (5 egyén)  $11\pm 4\%$  volt ez az arány (5. ábra A).

Két tünetes pikkelysömörös minta analízise a tünetmenteshez hasonló eredményt mutatott:  $27\pm 1\%$  volt az  $\alpha 5$  integrin pozitív sejtek aránya. A pozitív sejtek arányában mutatkozó különbség mellett figyelemre méltó különbség mutatkozott az  $\alpha 5$  integrin pozitivitás intenzitásának mértékében is a pikkelysömörös tünetmentes epidermális sejteken. A normál sejtek relatív maximális fluoreszcenciája  $0,151\pm 0,08$  volt, ehhez képest a tünetmentes pikkelysömörös sejteken ez az érték  $0,649\pm 0,1$ , tehát nem csak jóval több sejt fejezi ki az  $\alpha 5$  integrint a pikkelysömörös epidermiszben, mint a normál bőrben, hanem az egyes sejtek általi  $\alpha 5$  integrin kifejeződés mértéke is jóval nagyobb (5. ábra B).





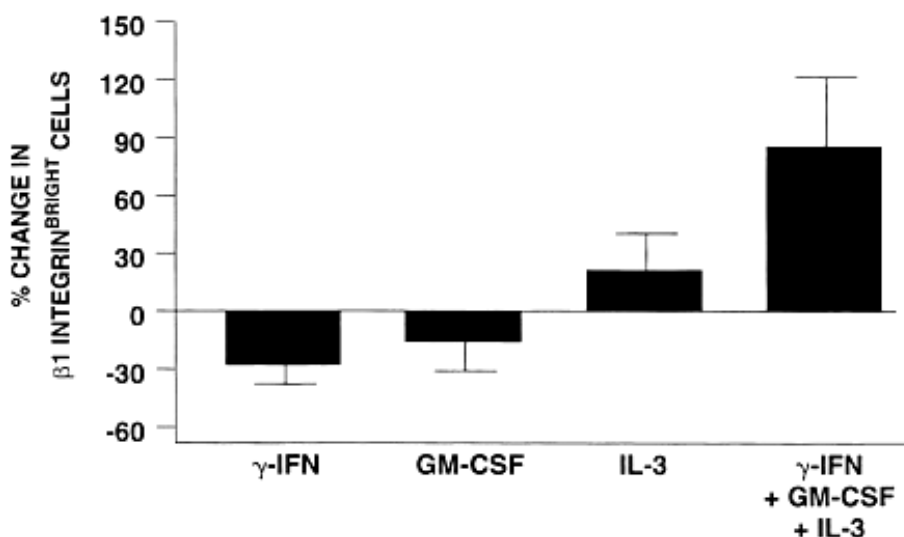
5. ábra

Pikkelysömörös tünetmentes (fekete oszlopok) és normál (fehér oszlopok) bőr  $\alpha 5$  integrint kifejező epidermális sejtjeinek %-os arányát mutatja az A rész, a pozitív sejtek relatív maximális fluoreszcenciáját mutatja a B rész. A pikkelysömörös tünetmentes bőrben nemcsak az  $\alpha 5$  integrint kifejező sejtek száma, hanem a pozitív sejtek fluoreszcenciája is jóval erősebb. Az oszlopok az átlagokat $\pm$ SE mutatják, a független minták száma 10 a betegeken, 5 az egészségeseken.

### 5.1.3. A rekombináns $\gamma$ IFN csak a GM-CSF és IL-3 jelenlétében indukál sejtprolifерációt a nem léziós bőrből származó pikkelysömörös keratinocitákban

A korábbi vizsgálatainkban észlelt tünetes pikkelysömörös bőrből származó T sejt klónok által in vitro aktiváció hatására termelt és a pikkelysömörös tünetmentes keratinocita össejtekre sejtciklust indukáló hatású felülűszót rekombináns limfokinekkal helyettesítve, próbáltuk modellezni azt a limfokin-környezetet, melyben a tünetmentes keratinocita össejtek fokozott sejtciklus indukciója bekövetkezik. A frissen szeparált tünetmentes bőrből származó epidermális sejteket rövid idejű tenyésztésnek vetettük alá GM-CSF (1 ng/ml), IL-3 (0,3 ng/ml),  $\gamma$ INF (100 U/ml) és e három limfokin keverékét tartalmazó sejt-környezetben. A limfokin koncentrációkat a felülűszókban észlelt koncentrációk és a gyártó cég által megadott aktivitási görbék alapján határoztuk

meg. A sejteket 72 óráig tenyésztettük, majd áramlásos citometriával mértük a  $\beta 1$  integrint erősen kifejező sejtpopuláció arányát a tenyészetekben. Korábbi vizsgálataink igazolták, hogy ezekben a tenyésztési modellekben a  $\beta 1$  integrint erősen kifejező sejtek populációjának nagysága arányos a korai tenyészetben sejtciklusba kerülő (az S/G2M fázisú sejtek százalékos arányával meghatározható, illetve a tenyészetben PCNA pozitivitást *de novo* kifejező sejtek mérésével meghatározható), proliferálódó sejtek számával (Bata-Csörgő és mtsai., 1995). Önmagában egyik limfokin sem befolyásolta a sejtnövekedést, viszont a három limfokin keveréke szignifikánsan megnövelte a sejtek növekedését a kontroll médiumban növő sejtekhez képest,  $p=0,005$ , Student's t-teszt (6. ábra).



6. ábra

Pikkelysömörös tünetmentes bőrből származó epidermális sejteket 3 napig tenyésztettünk a rekombináns limfokinek jelenlétében. Ezt követően áramlásos citometriás analízissel meghatároztuk a tenyésztett sejtek között a  $\beta 1$  integrint erősen kifejező sejtek és az S/G2M fázisban levő sejtek arányát. Az ábrán a  $\beta 1$  integrint erősen kifejező sejtpopuláció %-os eltérését tüntettük fel a kontroll, limfokint nem tartalmazó tenyészetekhez képest. 5 független minta átlagát $\pm$ SE mutatják az oszlopok.

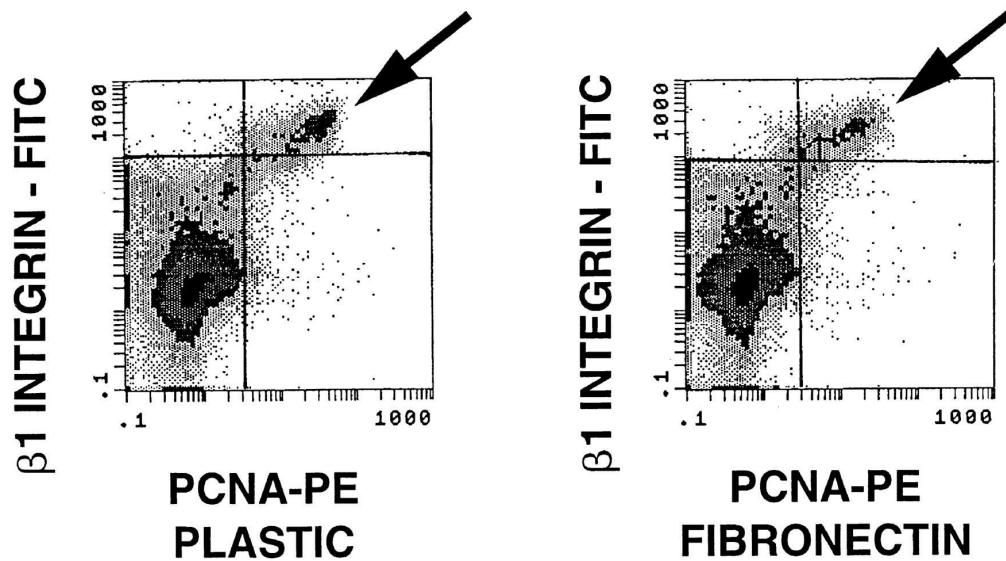
#### 5.1.4. A fibronectin potenciálja a T sejt limfokinek sejtproliferációt fokozó hatását a pikkelysömörös keratinocita őssejtre

Figyelembe véve, hogy a pikkelysömörös tünetmentes bőrben bazálisan elhelyezkedő keratinocita őssejt sejt környezetében a normálistól eltérően fibronectin található, a következőkben megvizsgáltuk, milyen hatással van e sejtek korai *in vitro* növekedésére a fibronectin jelenléte, ez a hatás eltér-e a fibronectin normál hámsejtekre gyakorolt hatásától és a fibronectin befolyásolja-e a limfokinek hatását.

Vizsgálatainkban először arról győződünk meg, hogy a fibronectin mátrixon való tenyésztése a sejteknek nem befolyásolta az általunk korábban leírt erős  $\beta 1$  integrin kifejeződés és a sejtciklus indukció szoros kapcsolatát. Normál bőrből származó keratinociták 72 órás tenyésztését követően multiparaméteres flow citometriás analízissel vizsgáltuk a sejtek  $\beta 1$  integrin, PCNA kifejeződését és sejtciklusát. A fibronectin jelenléte e három paraméter párhuzamos alakulását nem befolyásolta a sejtekben. A tenyésztőedényen nőtt sejtek és a fibronectinnel bevont felületen növvő sejtek kultúráiban a  $\beta 1$  integrin erős kifejeződése azokra a sejtekre volt jellemző, melyek a tenyészetben *de novo* PCNA pozitívvá váltak (7. ábra), jelezve, hogy a sejtek sejtciklus indukciója bekövetkezett.

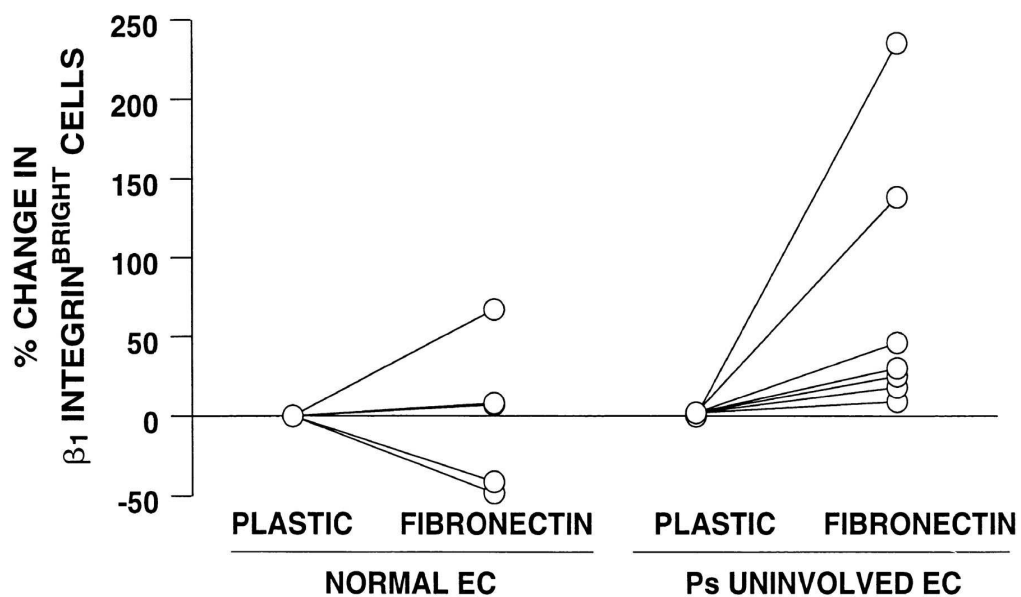
Ezt követően tünetmentes pikkelysömörös és normál bőrből származó epidermális sejteket előzőleg fibronectinnel bevont tenyésztőedényekben tenyésztettünk, a tenyésztőkörnyezet az alapmédium, illetve rekombináns GM-CSF+IL-3+ $\gamma$ IFN tartalmú médium volt. Kontrollként a bevonatlan műanyag tenyésztőedényben tenyésztett sejtek szolgáltak. A fibronectin jelenléte valamelyest, de nem szignifikánsan elősegítette a sejtek korai növekedését a tünetmentes pikkelysömörös epidermális sejtek esetében, hasonló jelenség nem látszott a normál sejtek tenyészetében (8. ábra). Viszont a T sejt limfokinek sejtnövekedést indukáló hatását a fibronectin legalábbis additíven, de néhány kultúrában szinergista módon (7 független minta) fokozta tünetmentes pikkelysömörös keratinociták esetében. Normál sejteken semmiféle befolyása nem volt a fibronectin + T sejt limfokin környezetnek a sejtek növekedésére (9. ábra). A 10. ábra egy pikkelysömörös tünetmentes minta reprezentatív eredményét mutatja, a fibronectin és T sejt limfokinek hámsejt proliferációt indukáló hatásáról.

**72 HOURS**



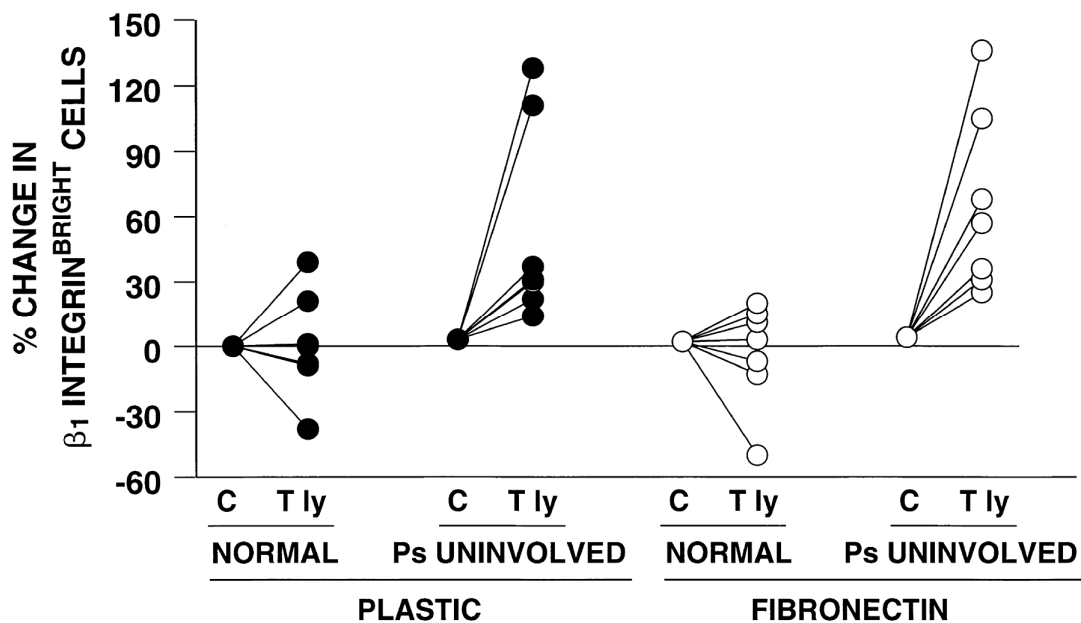
7. ábra

A keratinociták rövid idejű ex vivo tenyésztésében a sejtek a fibronektinnel bevont edényen és a tenyésztő műanyagon hasonlóan nőnek. A 72 órás tenyésztést követően a sejteket  $\beta 1$  integrin és PCNA elleni monoklonális ellenanyagokkal jelölve, majd áramlások citometriás analízissel vizsgálva a kétparaméteres diagramon látható, hogy a proliferálódó, PCNA-t kifejező sejtek azok, melyek a  $\beta 1$  integrint is erősen kifejezik.



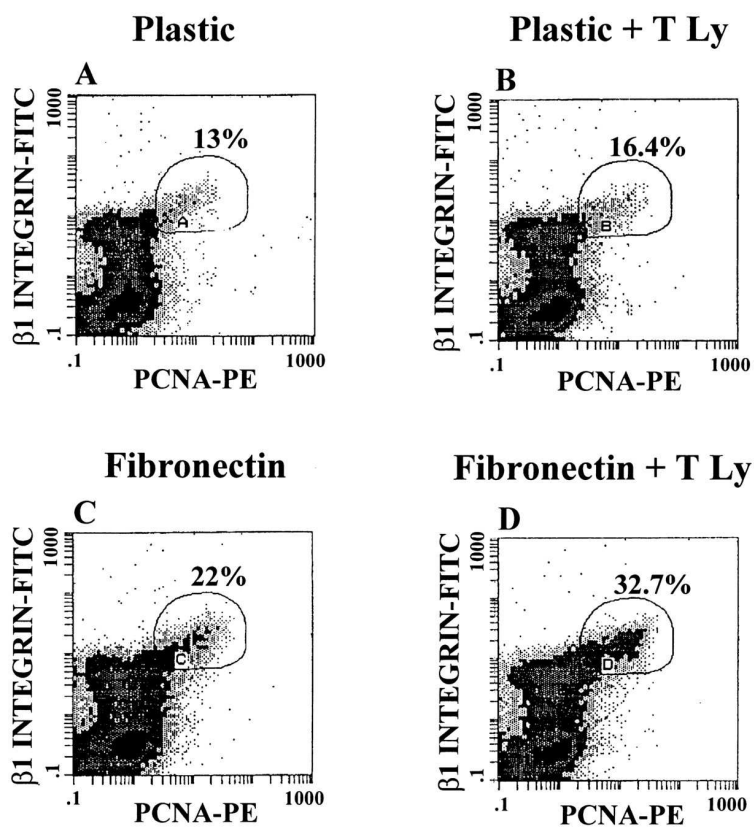
8. ábra

A tünetmentes bőrből származó keratinociták esetében a fibronektinnel bevont tenyésztőedényben konzekvensen, de nem szignifikánsan, magasabb volt a  $\beta_1$  integrin erősen kifejező, proliferálódó sejtek aránya a műanyag tenyésztőedényben tenyésztett sejtetekhez képest (jobb oldali ábra, 7 független tenyészet). Hasonló különbséget a normál bőrből származó rövid idejű *ex vivo* keratinocita tenyészetekben nem észleltünk (bal oldali ábra, 6 független tenyészet).



9. ábra

Normál (6 független minta) és tünetmentes pikkelysömörös (7 független minta) bőrből származó epidermális sejteket 72 óráig tenyésztettünk műanyag tenyésztőedényben és fibronectinnel bevont tenyésztőedényben limfokinek keverékének (IL-3+GM-CSF+ $\gamma$ IFN, T ly) jelenlétében, vagy nélkülük (kontroll, c). Ezt követően a sejteket  $\beta_1$  integrin ellenes ellenanyaggal és propidium jodiddal festettük, majd áramlásos citometria analízissel meghatároztuk a  $\beta_1$  integrint erősen kifejező sejtek és az S/G2M fázisú sejtek arányát a mintákban. Az ábrán a  $\beta_1$  integrint erősen kifejező sejtek %-os eltérése van feltüntetve a limfokinek tartalmazó tenyészetekben a limfokin-mentes kontroll tenyészetekhez képest a műanyag és a fibronectinnel bevont tenyésztőedényekben.



10. ábra

Ezen az áramlásos citometriás vizsgálattal nyert diagramon egy reprezentatív minta eredménye látható. Ebben a mintában egy pikkelysömörben szenvedő beteg tünetmentes bőréből származó hámsejtek 72 órás tenyésztésének áramlásos citometriás analízisét látjuk. A körrel határolt területek a tenyészet proliferálódó sejtpopulációját ( $\beta 1$  integrint erősen és PCNA-t kifejező sejtek) jelölik. Az alaplémiumban, fibronectin bevonat nélküli edényben tenyésztett sejtekben a proliferatív sejtpopuláció az összes sejtek 13%-a, mind a T sejt limfokinek, mind a fibronectin jelenléte esetén a proliferatív sejtpopuláció megnő, 16,4% a T sejt limfokinek hatására és 22% a fibronectin hatására, a fibronectin és a T sejt limfokinek együttes hatása eredményezi a legnagyobb növekedést a proliferatív sejtek relatív arányában, 32,7%.

#### 5.1.5. A fibronectin sejtnövekedést fokozó hatása nem a sejttapadás függvénye

Az általunk alkalmazott alacsony (20  $\mu\text{g/ml}$ ) fibronectin koncentráció mellett a tenyésztőedényben a sejtek letapadása valószínűleg nem elsősorban a fibronectinen keresztül zajlott. Azonban nem lehetett kizárni, hogy a fibronectin által okozott tünetmentes pikkelysömörös keratinocitákon észlelt fokozott sejtnövekedés nem annak volt az eredménye, hogy az összejt típusú keratinociták (K1/K10<sup>-</sup> sejtek), melyek a tünetmentes bőrben *in vivo* eleve fokozottabban kifejezik az  $\alpha 5$  integrint, gyorsabban tapadtak le a tenyésztés kezdetén, mint a normál sejtek. Ezáltal a sejtek korábban kerültek olyan helyzetbe, mely alkalmassá tette őket a sejtciklus megkezdésére, a citoplazmikus elemek reorganizációját követően.

A kérdés eldöntésére műanyag edényre és fibronectinnel bevont edényre tünetmentes pikkelysömörös és normál epidermális sejteket helyeztünk, majd 24 óra múlva meghatároztuk a K1/K10<sup>-</sup> sejtek relatív arányát a letapadt sejtpopulációban.

A fibronectinnel bevont edényre letapadt K1/K10<sup>-</sup> sejtek aránya  $62\pm 5\%$ , a bevonatlan edényre letapadt K1/K10<sup>-</sup> sejtek aránya  $59\pm 5\%$  volt a tünetmentes pikkelysömörös sejtek esetében, a normál sejteknél ez az arány  $34\pm 11\%$  volt fibronectines edényen és  $36\pm 6\%$  a bevonatlan edényen.

Ez az eredmény azt bizonyította, hogy a sejtnövekedésben észlelt változást nem a keratinocita összejt letapadásában jelentkező különbség okozta.

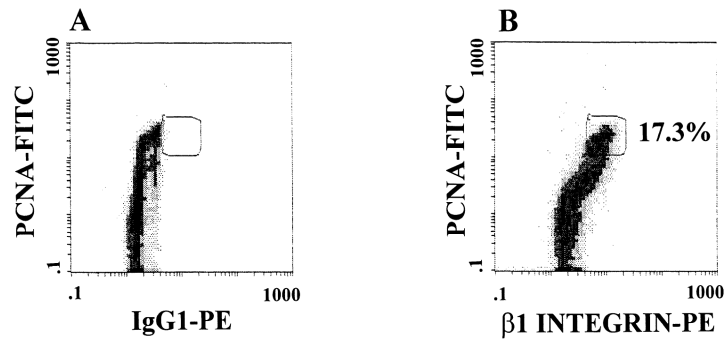


#### 5.1.6. A fibronectin a keratinociták növekedését a sejt tapadásától függetlenül is képes befolyásolni

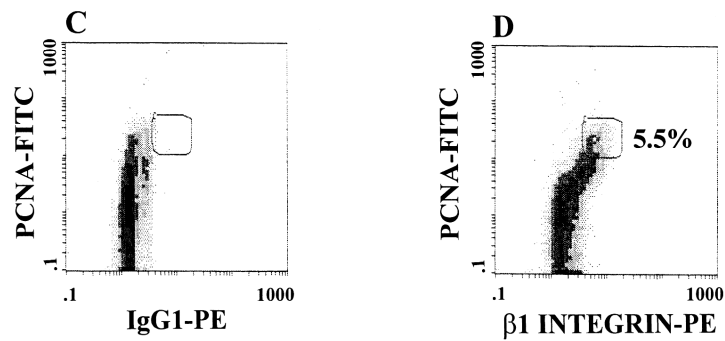
Miután bizonyítottuk, hogy a 20 µg/ml fibronectinnel való bevonása a tenyésztőedénynek nem befolyásolta az összejt típusú keratinociták letapadását tenyészetünkben, bizonyítani kívántuk, vajon ez az alacsony koncentrációjú fibronectin valóban képes a sejtheadhéziótól függetlenül befolyásolni a keratinociták *in vitro* növekedését. Ennek érdekében fibronectinnel bevont edénybe helyeztünk frissen szeparált normál keratinocitákat, majd 24 óra múlva, amikor a sejtek letapadása már megtörtént, a tenyészethez neutralizáló hatású  $\alpha 5$  integrin monoklonális ellenanyagot adtunk. Kontrollként az ellenanyaggal azonos koncentrációjú egér IgG1-et tartalmazó tenyészet szolgált. (Bár a normál *in vivo* bőrben a hámsejtek alig fejezik ki az  $\alpha 5$  integrint, tenyészetben rövid idő alatt megjelenik a sejteken az  $\alpha 5$  integrin kifejeződése). 24 óra múlva mértük a tenyészetekben megjelenő PCNA és  $\beta 1$  integrin erősen pozitív sejtek arányát.

A kontroll tenyészetben 17,3%, ehhez képest a monoklonális  $\alpha 5$  integrin ellenanyagot tartalmazó tenyészetben csak 5,5% volta a PCNA<sup>+</sup>  $\beta 1$  integrin<sup>erősen+</sup> sejt, jelezve, hogy az  $\alpha 5$  integrin fibronectin kötés megakadályozása a sejtek proliferációját a letapadástól függetlenül is képes befolyásolni (11. ábra). Ugyanezt a kísérletet Arg-Gly-Asp peptiddel megismételve, hasonló sejtnövekedés gátlást észleltünk a kontroll peptidhez képest.

## IgG1 ISOTYPE TREATED EC



## ANTI-ALPHA 5 TREATED EC



11. ábra

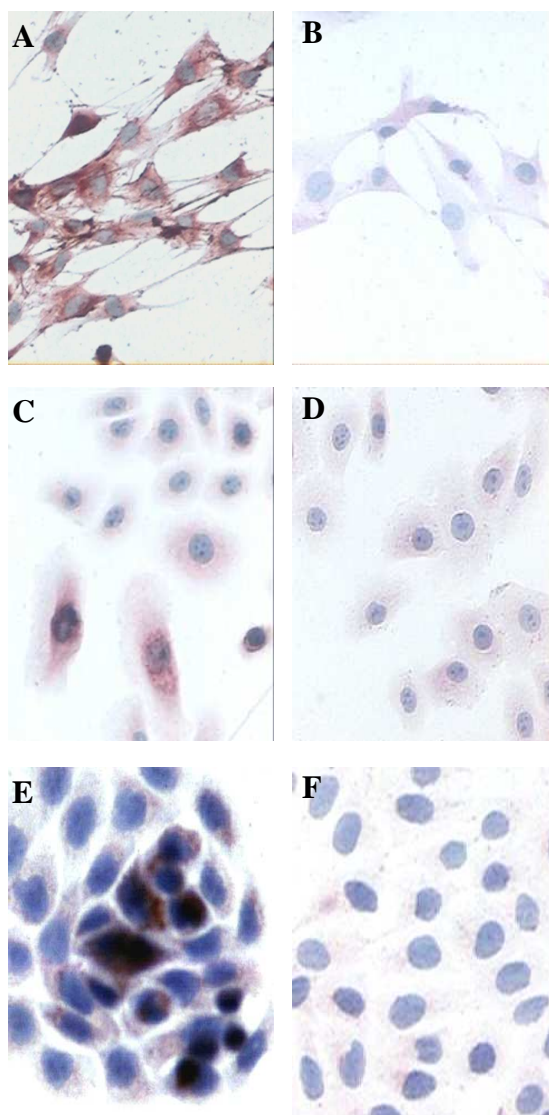
Az ábra két napig tenyésztett normál epidermális sejtek áramlási citometriás analízisét mutatja. A sejteket PCNA és  $\beta 1$  integrin ellenes monoklonális ellenanyaggal jelöltük. A tenyészetekhez a tenyésztés utolsó 24 órájában egér IgG1-t (A, B), illetve egér anti-humán, blokkoló hatású,  $\alpha 5$  integrin ellenes ellenanyagot (C, D) adtunk. Az izotipikus kontroll jelölésekhez képest a mindkét ellenanyaggal pozitív jelölést mutató ( $\text{PCNA}^+\beta 1$  integrin<sup>erősen+</sup>) sejtpopulációk körül vannak rajzolva.

#### 5.1.7. A hámsejtek EDA<sup>+</sup> onkofötális fibronektint termelnek

Láttuk, hogy a pikkelysömörös tünetmentes bőrben a normál bőrtől eltérően a bazális keratinociták sejtkörnyezetében plazma eredetű fibronektin található. A fibronektin molekulának több izoformája ismert, melyek ugyanazon gén 3 exonjának (extra domén-A (EDA), extra domén-B (EDB) és a III-CS domén) alternatív hasítása következtében képződnek. A hepatocyták által termelt plazma fibronektin nem tartalmazza sem az A sem a B extra doméneket. A többi sejt által termelt úgynevezett celluláris fibronektin (cFN) azonban különböző variációkban és összetételben tartalmaz EDA és EDB fragmenteket. A cFN inszolubilis és a sejt közvetlen környezetében található pericelluláris mátrix inkorporálja.

Az EDA domén jelenléte jellemző az embrionális szövetekre, de felnőtt szövetekben normális körülmények között nem található, kivéve bizonyos patológiás eseteket, mint például sebzés, rheumatoid arthritis, epitheliális fibrosis és vasculáris intima proliferáció. Ting és munkatársai 2000-ben kimutatták, hogy a pikkelysömörös tünetmentes bőrben a dermo-epidermális junkció (DEJ) mentén EDA motívumot tartalmazó fibronektin van jelen, valamint azt is, hogy ennek termeléséért nem a dermális fibroblaszt felelős (Ting és mtsai., 2000). Bár Rothaupt munkatársaival kimutatta, hogy a dermisz CD11c<sup>+</sup> sejtei és az EDA<sup>+</sup> fibronektin kolokalizálódik a pikkelysömörös léziós bőrben, mivel a tünetmentes bőrben csak elvétve található ilyen sejt, nem valószínű, hogy az észlelt EDA<sup>+</sup> kifejeződés ezen sejtek működéséhez kapcsolható volna (Rothaupt és mtsai., 2000).

A keratinociták EDA<sup>+</sup> fibronektin termeléséről nem volt irodalmi adat, ezért megvizsgáltuk, vajon a hámsejtek képesek-e ilyen típusú fibronektin izoforma termelésére. Immuncitokémiai festéssel egy az EDA<sup>+</sup> fibronektinre specifikus monoklonális ellenanyaggal kimutattuk, hogy mind a tenyésztett normál, mind pedig a HaCaT keratinociták kifejezik az EDA<sup>+</sup> fibronektint (12. ábra). Ez alapján feltehetjük, hogy a tünetmentes pikkelysömörös bőrben a DEJ mentén található EDA<sup>+</sup> fibronektin a keratinociták által termelődik.



12. ábra

Fibroblasztok (A, B), tenyésztett normál felnőtt humán keratinociták (C, D), és HaCaT keratinociták (E, F) immunfestését látjuk az EDA<sup>+</sup> fibronektinre specifikus monoklonális ellenanyaggal (A, C, E), illetve izotipikus kontroll immunglobulinnal (B, D, F). A fibroblasztokban látszik a legerősebb citoplazmikus jelölés (A), a keratinocitákban kevésbé kifejezett az EDA<sup>+</sup> fibronektin kifejeződés (C, E), ezekben főleg a mitotikus sejtek festődnek.

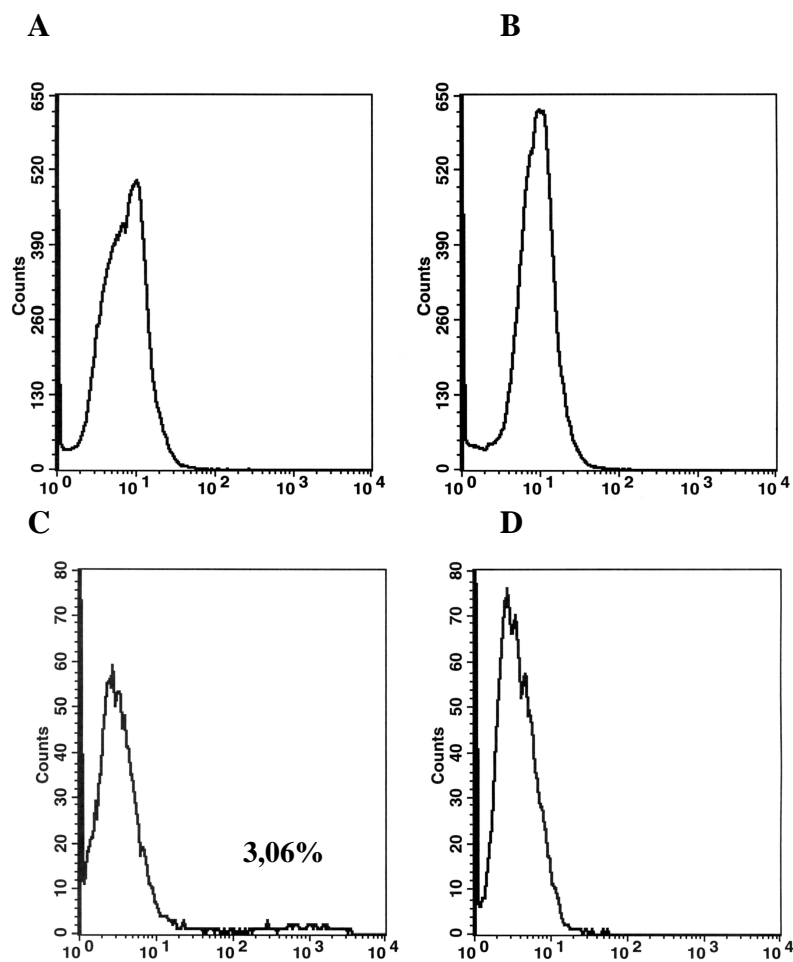
5.1.8. Egy kis szubpopulációja a pikkelysömörös tünetmentes keratinocitáknak rövid idejű tenyésztés során EDA<sup>+</sup> onkofötális fibronektint fejez ki, hasonló jelenség normál keratinocita rövid tenyésztése során nem észlelhető

Ezt követően összehasonlítottuk a frissen szeparált tünetes, tünetmentes pikkelysömörös és normál bőrből származó epidermális sejtek EDA<sup>+</sup> fibronektin tartalmát immunfestést és áramlásos citometriás analízist alkalmazva, de nem találtunk különbséget a mintákban, egyik mintában sem festődtek a sejtek. (A festési metodika működéséről tenyésztett fibroblasztok alkalmazásával győződünk meg, ebben az esetben a sejtek erősen kifejezték az EDA<sup>+</sup> fibronektint.)

Feltételezve, hogy keratinociták valamilyen aktivációs ingert igényelnek az EDA<sup>+</sup> fibronektin szintetizálásához, megnéztük, hogyan alakul az EDA<sup>+</sup> fibronektin kifejeződése a hámsejtekben egy rövid idejű tenyésztést követően. Normál bőrből és tünetmentes bőrből származó sejteket 72 óráig tenyésztettünk, majd immunfestést követően áramlásos citometriával meghatároztuk a pozitív sejtek arányát.

Ellentétben a normál bőrből származó sejtekkel, ahol továbbra sem észleltünk egyetlen sejtben sem EDA<sup>+</sup> fibronektint, a pikkelysömörös tünetmentes epidermális sejtek analízise során a sejtek egy kis populációjában (3,06%) megjelent az EDA<sup>+</sup> fibronektin (13. ábra).

Ez az eredmény alátámasztja azt az elképzelésünket, hogy a pikkelysömörös tünetmentes bőrben a DEJ mentén található EDA<sup>+</sup> fibronektin forrása valóban lehet a keratinocita, ezen túlmenően ismét látunk egy olyan tulajdonságot, melyben a pikkelysömörös tünetmentes bőr hámsejtje a normál bőr hámsejtjétől eltér.



13. ábra

Az ábra 72 óráig tenyésztett pikkelysömörös tünetmentes (A, C) és normál (B, D) epidermális sejtek EDA<sup>+</sup> fibronektinre specifikus monoklonális ellenanyaggal való jelölését követő áramlások citometriás analízis eredményét mutatja. A normál mintában az izotipikus kontrollnál (B) erősebb jelet egyetlen sejt sem ad az ellenanyaggal jelölt mintában (D). A pikkelysömörös tünetmentes epidermális sejtek között az ellenanyaggal jelölt mintában (C) a sejtek egy kis populációja (3,06%) az izotipikus kontrollhoz (A) képest kifejezetten erős fluoreszcens intenzitást mutat.

5.2.1. A proliferálódó HaCaT keratinocitákban az  $\alpha 5$  integrin kifejeződés felerősödik, ezzel párhuzamosan a sejtek keratin1/10 expressziója csökken.

Normál epidermiszben immunfluoreszcens mikroszkópos vizsgálattal azt látjuk, hogy a  $\beta 1$  integrin pozitív sejtek főleg a bazális sejtsorban helyezkednek el, a keratin 1/10 (K1/K10) kifejeződés ezzel ellentétben a szuprabazálisan elhelyezkedő sejtsorokra jellemző, a bazális sejtek K1/K10 negatívak (Bata-Csörgő és mtsai., 1993). Ha a pikkelysömör betegség jellegzetes bőrelváltozását immunfluoreszcens mikroszkóppal vizsgáljuk, azt látjuk, hogy a normál bőr epidermisztől eltérően nemcsak a bazális sejtsor, hanem afölött még 2-3 sejtsor  $\beta 1$  integrint kifejező sejtekből áll, ugyanakkor a K1/K10 kifejeződés is 2-3 sejtsorral fentebb észlelhető (Bata-Csörgő és mtsai., 1993). A hiperproliferálódó pikkelysömörös epidermiszben a normál bőrtől eltérő  $\alpha 5$  integrin kifejeződés szintén észlelhető a szuprabazális sejteken is (Pellegrini és mtsai., 1992).

A következőkben arra voltunk kíváncsiak, milyen módon kapcsolódik a jellegzetesen hiperproliferálódó sejtekre jellemző  $\alpha 5$  integrin és a terminális hámsejt differenciáció első lépésének tekinthető K1/K10 kifejeződés a hámsejtekben a sejtek különböző proliferációs/differenciációs állapotában. Vizsgálatainkat egy immortalizált keratinocita sejtvonalon (HaCaT) végeztük.

A HaCaT sejtek bár immortalizáltak és genetikusan különböznek a normál sejtektől, sok tekintetben jól modellezzik a normál hámsejteket (Ryle és mtsai., 1989). A normál keratinocitákhoz hasonlóan ezek a sejtek *in vitro* organotipikus kultúrában vagy csupasz egérre transzplantálva többretegű hámot képeznek, bazális membránt szintetizálnak és keratinizálódnak (Breitkreutz és mtsai., 1998; Schoop és mtsai., 1999). Végtelennek ítéltető proliferatív kapacitásuk mellett igen gyorsan osztódnak *in vitro*, ugyanakkor megtartották tapadásfüggőségüket.

Vizsgálatainkat egy olyan HaCaT sejt kultúra-modellel végeztük, melyben a sejteket kontakt gátlás és éheztetés által sejtnyugalmi (quiescent) állapotba kényszerítettük, majd a kontakt gátlás és éhezés feloldásával (a sejtek átpasszálása szérumban tartalmazó médiumba) a sejteket proliferációra készítettük. Ilyen körülmények között a sejtek jelentős hányada sejtciklusba kerül, osztódik, majdnem szinkronizáltan a passzálást követő pár napban. A sejtek ciklusát propidium jodid festéssel és sejtciklus analízissel követtük a kultúrában. Párhuzamosan néztük a sejtek ciklin D1,  $\alpha 5$  integrin és K1/K10 mRNS, valamint az  $\alpha 5$  integrin és K1/K10 fehérjeszintű kifejeződését.

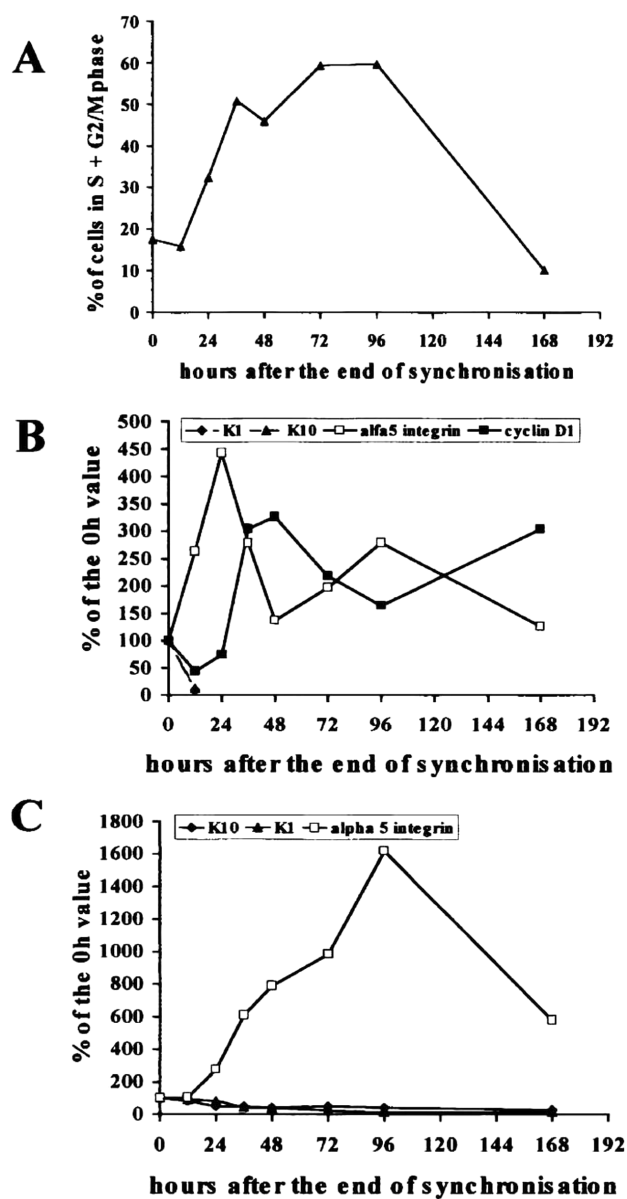
A korai *ex vivo* keratinocita tenyészetben a normál bőrben sejtnyugalmi (G0) állapotban levő keratinociták PCNA negatívak. A PCNA a sejtekben a G1 fázis közepén jelenik meg, majd ezt követően kifejeződése gyengül, de az S/G2M fázisban levő sejtekben is kifejeződik. A PCNA szerepet játszik a DNS replikációban, repairben és a sejtciklus szabályozásában (Bravo és Macdonald-Bravo, 1987; Celis és mtsai., 1987; Celis és Celis, 1985; Celis és Madsen, 1986).

A sejtciklust szabályozó ciklinek közül a D típusúak szintén a ciklus G1 fázisához kötött funkcióval rendelkeznek, blokkolásuk a sejtek osztódását ebben a fázisban állítja le (Dowdy és mtsai., 1993; Pines, 1995; Sherr, 1993). A D típusú ciklineknek a többi ciklinton eltérően 3 izoformája ismert (D1, D2 és D3), a különböző D ciklin izoformák kifejeződése különbözik az egyes sejt típusokban. Saját vizsgálatainkból tudjuk, hogy mind a felnőtt humán bőrből származó, mind a HaCaTa keratinociták mindhárom izoformát kifejezik. A D1 típusú forma megjelenése a G0-G1 tranziton áthaladó keratinocitákra jellemző, míg a folyamatosan osztódó, tehát a G0 quiescent fázist kihagyó, keratinocitákban a másik két izoforma megjelenése dominál (Bata-Csörgő és mtsai., 1996).



A konfluens sejtkultúrában 1 hetes szérumentesség elegendő volt ahhoz, hogy a sejtek sejtciklusa leálljon, ekkor mind a D1 ciklin mRNS, mind a S/G2M fázisú sejtek száma nagyon alacsony a kultúrában (14. ábra B és A). A passzálást és a szérum visszaadását követően a sejtek  $\alpha 5$  integrin mRNS kifejeződése emelkedik először, 24 óránál elérve a legmagasabb kifejeződést, ugyanekkor a K1/K10 mRNS kifejeződés dramatikus csökkenése észlelhető a sejtekben (14. ábra B). A D1 ciklin mRNS kifejeződés 24-48 óra között emelkedik a sejtekben, majd a 48 óránál elért csúcst követően csökkenni kezd (14. ábra B). Az S/G2M fázisú sejtek számának növekedése ezzel részben párhuzamosan emelkedik, de csak 96 óránál kezd csökkenést mutatni (14. ábra A). Az  $\alpha 5$  integrin fehérje szintű kifejeződése az mRNS kifejeződés 24 órás csúcsát követően a 96 órás tenyésztésben éri el maximumát, majd csökkenni kezd, a K1/K10 fehérje szintű kifejeződése az üzenetben észlelt dramatikus csökkenést lassan követi, a K1 fehérje 96 óránál tűnik el, a K10 jelentősen csökkent mennyiségben, de még a 168 órás mintákban is detektálható (14. ábra C).

Normál hámsejtek esetében nincs arra vonatkozóan adat, hogy a sejtek képesek elveszíteni a már kifejeződött keratin 1/10-et. A HaCaT kultúrákban a tenyésztés során nem tapasztaltunk fokozott sejtelhalást, ami arra utalna, hogy egy kezdetben K1/K10 negatív sejtpopuláció aránytalan felnövekedése eredményezné a kultúrában a K1/K10 kifejeződés elvesztését, csökkenését. Feltételezhető tehát, hogy a HaCaT sejtekben a K1/K10 mRNS szuppressziója, illetve a fehérje degradációja a normál hámsejtektől eltérő, feltehetően a HaCaT sejt immortalizált voltaival kapcsolódó tulajdonság.



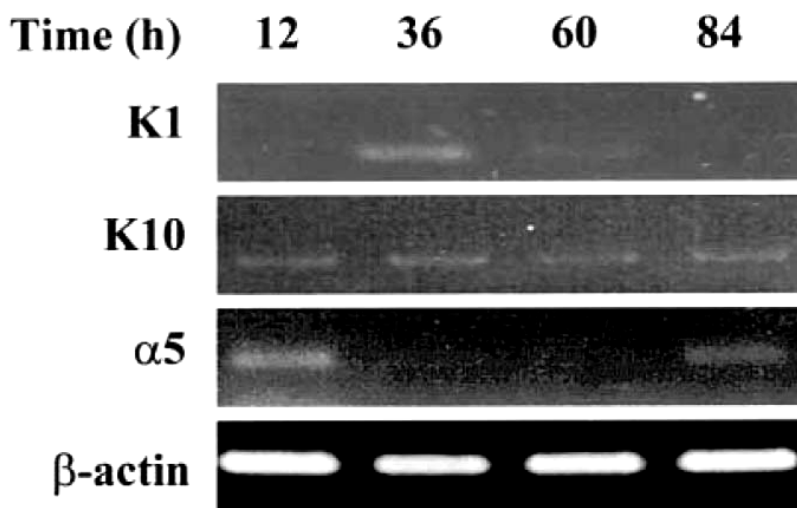
14. ábra

Az ábra a kontakt gátolt és szérumból éheztetett HaCaT sejtek DNS analízisét (A), K1/K10,  $\alpha 5$  integrin és D1 ciklin mRNS kifejeződését (B), valamint a K1/K10 és  $\alpha 5$  integrin fehérje szintű (C) kifejeződését mutatja a sejtek kontakt gátlásának és szérumbólvonásának megszűnte utáni napokban.

5.2.2. A keratin 1 és az  $\alpha 5$  integrin kifejeződést HaCaT keratinocitákban szérumban faktorok regulálják, a keratin 10 kifejeződést nem

Annak meghatározására, hogy a sejtekben észlelt  $\alpha 5$  integrin és K1/K10 mRNS kifejeződést szérumszint határozza-e meg, vagy a kontakt gátlás szabályozza-e, frissen passzált, nem konfluens sejtkultúrában növekvő HaCaT sejtekből elvettük a szérumszintet (a passzálást követően 12 órával), majd a szérumszint elvételét követően 24, 48 és 72 óra múlva vizsgáltuk az  $\alpha 5$  integrin és a K1/K10 mRNS kifejeződést a sejtekben.

A sejtekben alacsony K1/K10 mRNS kifejeződést észleltünk a szérumból való elvételekor (12 óra), 24 órával a szérumból való elvételt követően (36 óra) a K1 mRNS nagyon kifejezetten megemelkedett a sejtekben (15. ábra). Ugyanakkor a kezdeti relatív erős  $\alpha 5$  integrin kifejeződés szinte teljesen eltűnt a sejtekből 24 órával a szérumból való elvonást követően, viszont a szérumból való hiányától függetlenül 72 óra múlva ismét detektálható volt  $\alpha 5$  integrin mRNS a sejtekben, jelezve, hogy a szabályozás nem csak a szérumból való hatásokról függ (15. ábra). A szérumból való elvétele nem befolyásolta a K10 mRNS kifejeződését a sejtekben (15. ábra).

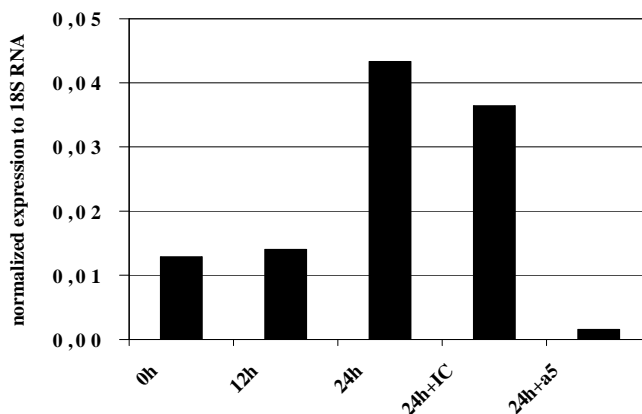


15. ábra

A HaCaT sejtekből a szérum elvonásakor (12 h), majd ezt követően 24 óránként izoláltuk az RNS-t. A PCR reakció Az  $\alpha 5$ -integrin (358 bp), keratin1 (316 bp), keratin10 (685 bp) és a belső kontroll  $\beta$ -aktin (406 bp) amplifikátumait agaróz gélen futtattuk és etidium bromiddal festettük.

### 5.2.3. Az $\alpha 5$ integrin blokkolása direkt gátolja a D1 ciklin mRNS kifejeződését HaCaT keratinocitákban

A kontakt gátolt és szérumban éheztetett HaCaT sejteket szérumban tartalmú tenyésztőfolyadékba passzáltuk, majd 12 óra múlva, mikor a sejtek teljes letapadása bekövetkezett a sejt-kultúrához neutralizáló hatású monoklonális  $\alpha 5$  integrin ellenes ellenanyagot adtunk. Kontrollként az ellenanyag koncentrációjával és izotípusával megegyező egér IgG1 szolgált. A sejtekben a tenyésztés indítását követő 24 óra múlva az  $\alpha 5$  integrin monoklonális ellenanyaggal kezelt kultúrákban a kontrollhoz képest jelentősen csökkent a D1 ciklin mRNS mennyisége (16. ábra). Ez az eredmény arra utal, hogy az  $\alpha 5$  integrin a sejtek tapadásától függetlenül képes a ciklin D1 kifejeződést szabályozni a sejtekben. Ebben a kísérleti modellben nem tudjuk eldönteni, hogy az  $\alpha 5$  integrin jelátvitel nélkül a sejt-környezet egyéb növekedési faktoraik képesek-e D1 ciklin kifejeződést indukálni a sejtekben vagy sem, elképzelhető, hogy az  $\alpha 5$  integrin hatása a legkorábban jelentkező a sejt-kultúrában, de az  $\alpha 5$  integrin blokkolás nem akadályozza a később jelentkező, más mitogének által szabályozott D1 indukciót.



16. ábra

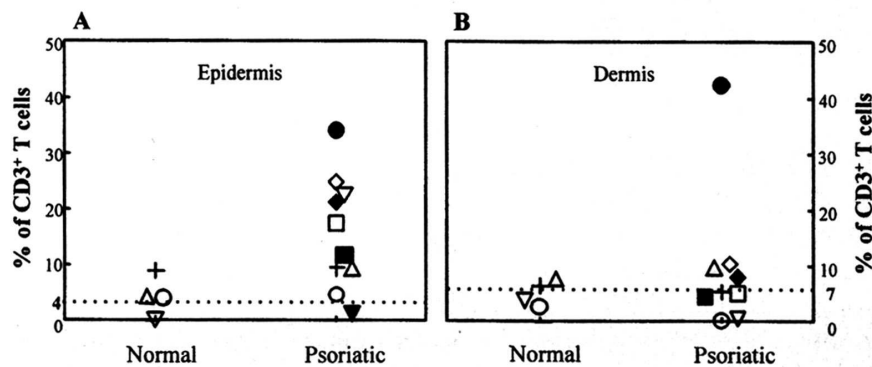
A szinkronizált HaCaT sejteket passzáltuk, majd a sejtek letapadását követően (12 h) a sejtekhez egér IgG1-et (izotípus kontroll, IC) és neutralizáló hatású  $\alpha 5$  integrin ellenes monoklonális ellenanyagot (a5) adtunk. Ezt követően 12 órával (24h) Q-RT-PCR reakcióval meghatároztuk a sejtekben a D1 ciklin mRNS kifejeződését, melyet a belső kontrollként használt 18 S RNS-hez viszonyítva ábrázoltunk.

5.3.1. A pikkelysömörös epidermiszben *in vivo* a CD3<sup>+</sup> T sejt  $\gamma$ IFN-t termel IL-4-et nem.

A korai *in vitro* tenyészetekben végzett vizsgálataink bizonyították, hogy a pikkelysömörre jellegzetes hám hiperproliferáció kialakulásában a bőrt infiltráló aktivált T sejtek limfokin termelésükkel szerepet játszhatnak. Láttuk azt is, hogy a  $\gamma$ IFN esszenciális komponense annak a limfokin környezetnek, mely a pikkelysömörös betegek tünetmentes bőréből származó összejt típusú keratinociták (K1/K10<sup>+</sup> sejtek) korai *in vitro* tenyészetekben adott, a normáltól eltérő hiperproliferatív reakcióját kiváltani képes.

Felmerült a kérdés, vajon az *in vivo* pikkelysömörös sejtkörnyezetben valóban jelen van-e a  $\gamma$ IFN? Th1 vagy Th2 limfokin profillal rendelkeznek a pikkelysömörös léziót infiltráló aktivált T sejtek? A kérdés megválaszolására normál és pikkelysömör léziós bőrt diszpázzal emésztve szétválasztottuk a dermiszt és az epidermiszt, majd minkettöből sejtuszpenziót készítettünk, ezt követően a sejteket 12-14 órán keresztül tenyésztettük. A tenyésztés utolsó 4 órájában PMA és ionomycin, valamint Brefeldin volt azokban a kultúrákban, melyekben a tenyésztést követően a sejtek intracelluláris  $\gamma$ IFN és IL-4 termelését vizsgáltuk, úgy, hogy a sejteket permeabilizálva monoklonális fluorokrómmal jelölt ellenanyagokkal inkubáltuk. Az intracelluláris limfokin ellenanyagokkal való jelölést megelőzte a sejtek monoklonális anti-CD3-mal való jelölése.

IL-4-et nem tudtunk kimutatni a sejtekben, ezt a negatív eredményt Western blottal, és RT-PCR reakcióval megerősítettük. Az IFN $\gamma$ -át termelő CD3<sup>+</sup> sejtek jóval nagyobb számban fordultak elő a pikkelysömörös léziós epidermiszben, ezzel ellentétben jóval kevesebb volt e sejtek aránya a pikkelysömörös dermiszben. A normál mintákban sem az epidermisz, sem a dermisz CD3<sup>+</sup> sejtei nem mutattak intracelluláris  $\gamma$ IFN festést (17. ábra). Ez az eredmény támogatja a  $\gamma$ IFN hatással kapcsolatos *in vitro* megfigyeléseink jelentőségét a pikkelysömörös léziós bőrelváltozásban kialakuló keratinocita hiperproliferáció lehetséges mechanizmusára vonatkozóan és támogatja azt a mások által más módszerekkel vizsgált megfigyelést, hogy a pikkelysömörben észlelhető gyulladás dominálón Th1-es típusú.



17. ábra

Az ábrán a normál és a pikkelysömörös tünetes epidermisz és dermisz CD3<sup>+</sup>  $\gamma$ IFN-t termelő sejtjeinek az összes CD3<sup>+</sup> sejt százalékában kifejezett arányát tüntettük fel. Az egyes szimbólumok a független minták eredményét mutatják. 4 egészséges epidermiszt és dermiszt, 10 pikkelysömörös epidermiszt és 9 dermiszt vizsgáltunk.

5.3.2. Pikkelysömörös betegek perifériás vérében szignifikánsan csökkent a CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> NK T sejtek aránya, a sejtek száma a betegség kezelésével párhuzamosan nő ugyan, de tünetmentes betegeken sem éri el az egészséges egyéneknél található szintet

A pikkelysömörben észlelhető Th1 dominancia kialakulásában, mely dominancia a perifériás vérben is detektálható, szabályozó szerepet játszhatnak az NK T sejtek. Az NK T sejtek heterogén sejtek, populációjukra jellemző az  $\alpha\beta$  vagy  $\gamma\delta$  T sejt receptorok és valamely NK receptor (CD 16, CD56, CD161, CD 94, CD158a és CD158b) jelenléte a sejt felszínén. Ezek a sejtek gyorsan, nagy mennyiségű citokin termelésre képesek, ezért feltehető, hogy a Th0 sejtek differenciációját Th1/Th2 irányba képesek befolyásolni. Rheumatoid arthritisben, mely szintén Th1 dominanciájú betegség, leírták, hogy a betegek vérében csökkent

a  $CD3^+ CD56^+$  NK T sejtek száma. Pikkelysömörös betegek (a betegek száma=15) perifériás vérében különböző kezelések előtt, valamint a különböző majdnem teljes tünetmentességet eredményező (Psoriasis Severity Index 4 alatt) kezelések után áramlásos citometriás vizsgálattal meghatároztuk ezen sejtek arányát. Önkéntes, egészséges véradók képezték a kontroll csoportot (kontrollok száma=12).

Eredményeink szerint a pikkelysömörös tünetes betegek perifériás vérében a  $CD3^+ CD56^+$  NK T sejtek aránya szignifikánsan csökkent az egészséges kontrollokhoz képest  $1,79 \pm 1,07\%$  a pikkelysömörös betegekben,  $5,22 \pm 1,74\%$  az egészséges egyénekben,  $p < 0,0001$ , (ANOVA, Tukey post hoc teszt). A különböző kezelések hatására a  $CD3^+ CD56^+$  NK T sejtek aránya megemelkedett a majdnem tünetmentessé váló betegekben  $2,68 \pm 1,04\%$ , de a normál egyénekben mért értékeknél ekkor is szignifikánsan alacsonyabb maradt, arra utalva, hogy a  $CD3^+ CD56^+$  NK T sejtek alacsony aránya a perifériás vérben nem a betegség aktivitására, hanem magára a betegségre jellemző. Az sem kizárt, hogy a perifériás vérben mért alacsony arány a sejtek fokozott bőrbe való áramlásának következménye.

A  $CD3^+ CD56^+$  NK T sejtek arányának csökkenése feltételezhető, hogy a Th2 típusú válasz gyengülését eredményezi, aminek következménye a Th1-es dominancia a betegségben. Intakt Th2-es válasz szükséges az immuntolerancia kialakulásához, hiányában autoimmun folyamatok alakulhatnak ki. Az NK T sejtek kóros funkciója jól dokumentált különböző autoimmun betegségekben. Azt, hogy az immunregulációs mechanizmusok fontos szerepet játszanak pikkelysömör betegségben jelzi az, az utóbbi időben közölt megfigyelés is, miszerint a betegségben mind a vérből, mind a bőrből származó  $CD4^+ CD25^{erős}$  kifejeződésű, Foxp3 pozitív, regulátoros T sejtek szupresszor funkciója elégtelen egészséges egyének hasonló sejtjeihez képest (Sugiyama és mtsai., 2005).

5.4. Mind a normál, mind a pikkelysömörös léziós bőrben az IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  és az IL-1RA kifejeződés az átmeneti osztódó (TAC) sejtpopulációban a legerősebb

*In vitro* vizsgálatok igazolták, hogy a keratinociták differenciációjával együtt változik a sejtek IL-1 kifejeződése (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  és az IL-1 receptor antagonist (IL-1RA)). A pikkelysömörös tünetes bőrben a normál bőrtől eltérő az IL-1 kifejeződése, normál bőrben az IL-1 $\alpha$  dominál az IL-1 $\beta$  felett, pikkelysömörben ez az arány fordított, jelentősebb az IL-1 $\beta$  mennyisége az epidermisz sejtjeiben. A pikkelysömörös tünetes bőrben az IL-1RA relatív aránya emelkedett az IL-1 $\alpha$ -hoz képest és az IL-1 intracelluláris bioaktivitás gátlása észlelhető.

Dupla jelölést alkalmazva monoklonális IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  és IL-1RA ellenes FITC-tal jelölt ellenanyagokkal valamint  $\beta$ 1 integrin ellenes PE-nel jelölt ellenanyaggal normál és pikkelysömörös epidermiszből frissen szeparált sejteket jelöltünk, a sejtek DNS tartalmát propidium jodiddal festettük. Áramlásos citometriás analízissel szétválasztottuk a  $\beta$ 1 integrin pozitív és negatív sejteket. Korábbi vizsgálataink igazolták, hogy az epidermális sejtek  $\beta$ 1 integrin pozitív populációján belül áramlásos citometriás analízissel a kisebb, kevésbé komplex citoplazmájú (keratinocita őssejt típusú sejtek) és a nagyobb, komplex citoplazmájú sejtek (átmeneti osztódó (TAC) sejtek) jól elkülöníthetők, így a  $\beta$ 1 integrin pozitív sejtek e két populációját is külön tudtuk vizsgálni. E három elektronikusan szétválasztott csoport IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  és IL-1RA tartalmát külön vizsgálva megállapítottuk, hogy az IL-1 $\alpha$  és IL-1RA kifejeződés mind a pikkelysömörös, mind a normál bőrben az átmeneti osztódó sejtpopulációban a legnagyobb, az IL-1 $\beta$  normál sejtekben szintén, de pikkelysömörös léziós keratinocitákban ez a különbség nem volt szembetűnő (18. ábra).

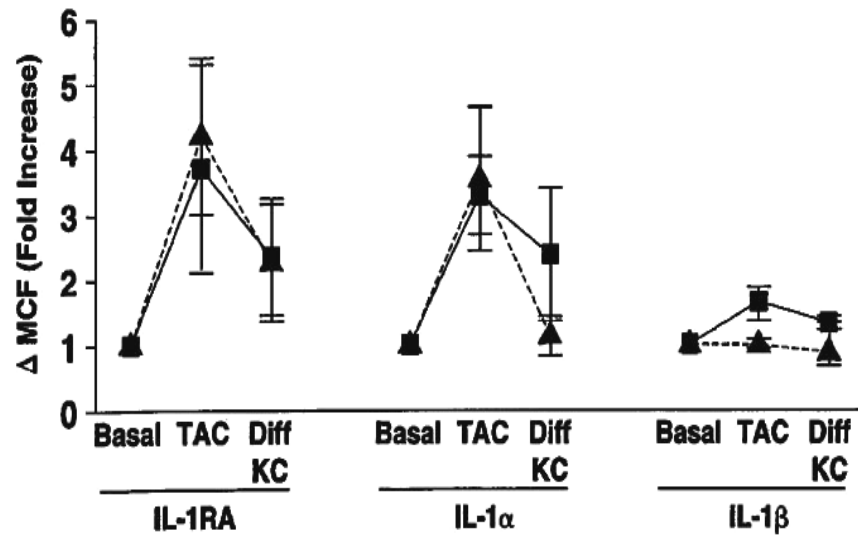
Ezt követően az egyes sejtcsoportokon belül megnéztük, a sejtciklus egyes fázisaiban hogyan alakul az IL-1 $\alpha$ , $\beta$ /RA kifejeződés. A normál és a pikkelysömörös tünetes epidermisz között itt is az IL-1 $\beta$  kifejeződésben észleltünk



különbséget, a normál sejtektől eltérően, ahol a keratinocita őssejtek ciklusában folyamatosan emelkedett az IL-1 $\beta$  kifejeződése, a pikkelysömörös keratinocitákban hasonló emelkedés nem volt megfigyelhető (19. ábra). Az átmeneti osztódó sejtcsoportban (TAC) szintén jelentős különbség mutatkozott az IL-1 $\beta$  kifejeződésben a normál és pikkelysömörös léziós sejtek között. A normál bőr TAC sejtjeinek ciklusa során a sejtekben folyamatosan emelkedett az IL-1 $\beta$ , ezzel ellentétben a pikkelysömörös léziós bőr TAC sejtjeinek ciklusában az IL-1 $\beta$  emelkedés nem volt megfigyelhető (19. ábra).

Ezen eredményeknek kétféle magyarázata lehetséges. Elképzelhető, hogy a tapasztalt eltérés a pikkelysömörös léziós hámsejtek sejtciklusa és IL-1 kifejeződése valamely környezeti reguláló működés következtében alakul ki, ugyanakkor azt sem lehet kizárni, hogy a pikkelysömörös hámsejt inherens különbségében rejlik az eltérések oka. Elképzelhető, hogy a hámsejtek IL-1 termelésének regulációja szorosan kapcsolódik a sejtek differenciálódási folyamataihoz, így az általunk is észlelt normálistól eltérő pikkelysömörben mutató IL-1 reguláció a kóros sejtdifferenciálódáshoz kapcsolódó jelenség.

Saját egyéb irányú kutatásainkból tudjuk, hogy a hámsejtek immunfunkcióinak egy része differenciálódásuk függvényében alakul. A természetes immunitásban szerepet játszó Toll (Toll-2, Toll-4) receptorok, valamint a keratinocita mannóz receptora is a differenciálódott, sejtfelszínhez közelebbi hámsejteken fejeződik ki, jelezve, hogy ezek a funkciók a sejt differenciálódásához kapcsolódtak (Pivarcsi és mtsai., 2004; Szolnoky és mtsai., 2001).

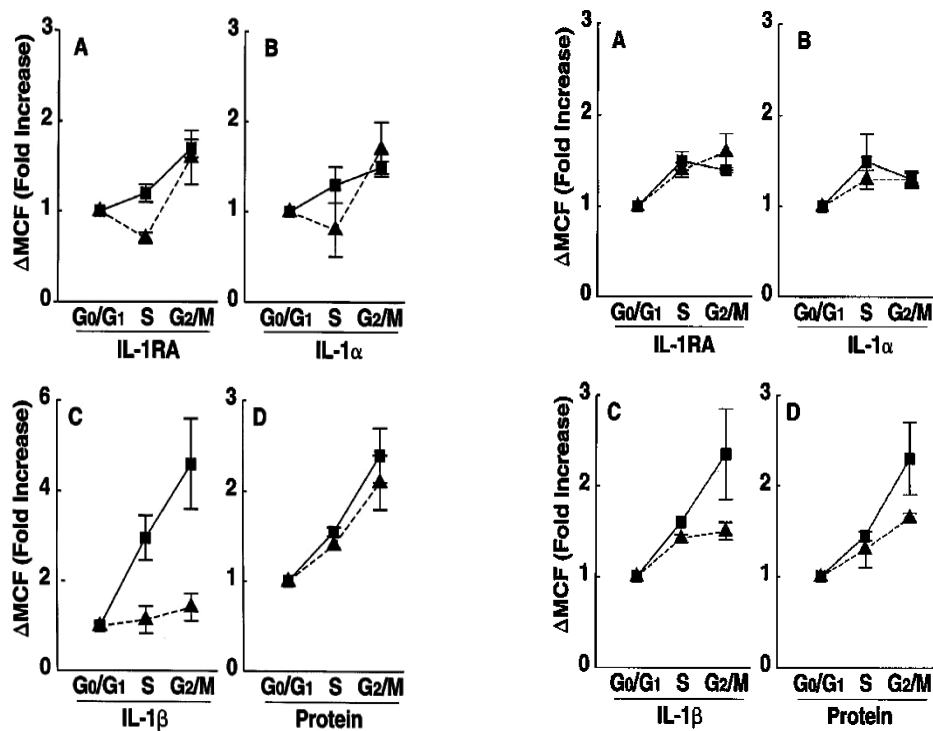


18. ábra

A pikkelysömörös tünetes (háromszöggel jelölve) és normál (négyzettel jelölve) bőrből szeparált epidermális sejteket  $\beta 1$  integrin, IL-1RA, IL-1 $\alpha$  és IL-1 $\beta$  monoklonális ellenanyagokkal jelöltük, majd a sejteket áramlásos citométerrel analizáltuk. A  $\beta 1$  integrin<sup>+</sup> sejtpopulációt a sejtek mérete és granuláltsága alapján elektronikusan választottuk szét bazális és TAC sejtpopulációkra, a  $\beta 1$  integrin<sup>-</sup> sejtek a differenciált keratinociták. Az egyes sejtpopulációkban mért átlag IL-1 fluoreszcencia (MCF) értékekből levontuk az izotípus kontrolloknál mért átlag fluoreszcencia értékeket ( $\Delta$ MCF), majd a bazális sejtek  $\Delta$ MCF értékével osztottuk a többi populáció  $\Delta$ MCF értékeit.

## Bazális sejtek

## Átmeneti osztódó (TAC) sejtek

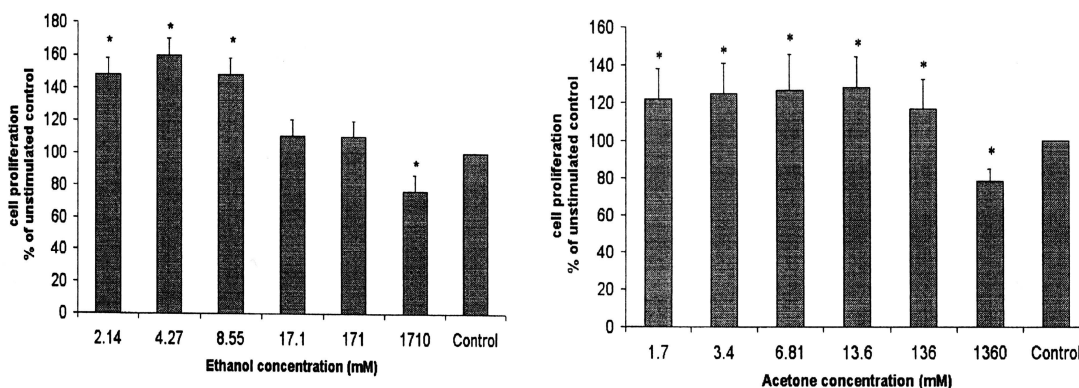


19. ábra

A pikkelysömörös tünetes (háromszöggel jelölt) és normál (négyzettel jelölt) bőrből szeparált epidermális sejtek proliferatív sejtpopulációit áramlásos citometriás analízissel elektronikusan szétválasztottuk méretük és granuláltságuk alapján. Ezeken a populációkon belül a DNS mennyisége alapján elektronikusan szétválasztottuk a sejtciklus különböző fázisaiban elhelyezkedő sejteket, majd a szétválasztott sejtszámokban mértük az IL-1 fluoreszcenciát. Az egyes sejtpopulációkban mért átlag IL-1 fluoreszcencia (MCF) értékekből levontuk az izotípus kontrolloknál mért átlag fluoreszcencia értékeket ( $\Delta$ MCF), majd a bazális sejtek  $\Delta$ MCF értékével osztottuk a többi populáció  $\Delta$ MCF értékeit.

5.5.1. Mind az etanol, mind az aceton megfelelő koncentrációkban képes a HaCaT keratinociták sejtproliferációját fokozni

Régi, bár klinikai evidenciákkal nem megfelelően alátámasztott megfigyelés, hogy a fokozott alkoholfogyasztás a pikkelysömör tüneteit provokálhatja, illetve a meglévő tüneteket rontja. *In vitro* megfigyeltük, hogy mind az aceton, mind az etanol megfelelő koncentrációkban szignifikánsan növeli a HaCaT sejtek növekedését. Félig konfluens sejteket 30 percig kezeltünk etanollal (2,14 mM-1,71 M) és acetonnal (1,7 mM-1,36 M). A sejtnövekedés vizsgálata BrDU beépülés méréseével történt. Szignifikánsan magasabb sejtnövekedést mértünk 48 órával a 2,14, 4,27 és 8,55 mM-os etanol kezelést követően (20. ábra). Az acetonos 30 perces kezelés 1,7, 3,4, 6,81, 13,6 és 136 mM-os koncentrációkban 24 óra múlva szignifikáns sejtnövekedést mutatott a kontroll kezeltlen sejtek növekedéséhez képest (20. ábra). Magasabb koncentrációkban mind az ethanol (1,71 M), mind az aceton (1,36 M) toxikus hatású volt a sejtekre.



20. ábra

Az ábrák a HaCat sejtek BrdU inkorporációval meghatározott proliferációját mutatják etanol (bal oldali diagramm) és aceton (jobb oldali diagramm) kezelésre. A proliferáció mértéke a kontroll, nem kezelt kultúrákban mért értékhez viszonyított %-ban kifejezett arány. Három független kísérlet, egy kísérleten belül 8 mérés átlaga $\pm$ SE van feltüntetve, \* $p < 0,05$ , (Student's t-teszt).

### 5.5.2. A sejtprolifерációt fokozó koncentrációjú acetón és az etanol fokozza a HaCaT sejtekben az $\alpha 5$ integrin, a D1 ciklin és a KGFR kifejeződését

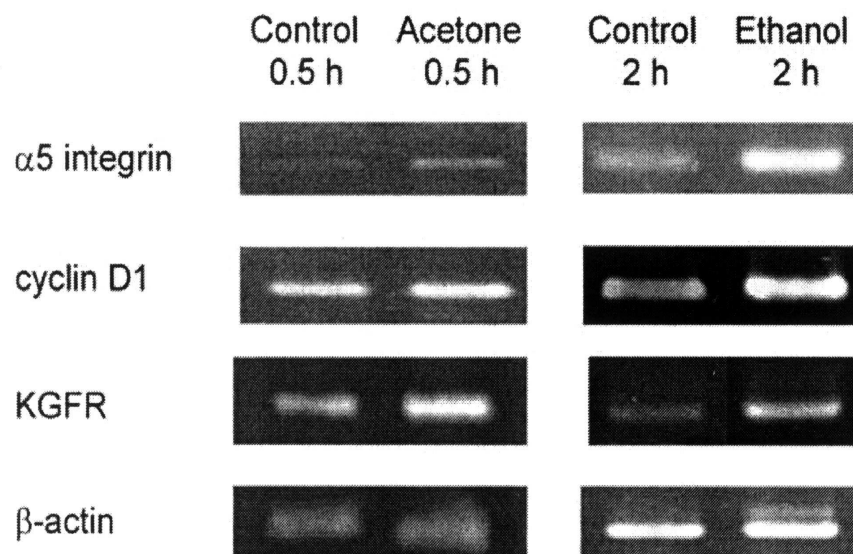
A következőkben megnéztük, hogy az etanol és acetón hogyan befolyásolja a sejtnövekedéssel kapcsolt  $\alpha 5$  integrin, ciklin D1 és KGFR gének mRNS kifejeződését. Mindhárom vizsgált mRNS szint megemelkedett az etanol (4,27 mM) esetében 2 órával, az acetón (13,6 mM) esetében 30 perccel a kezelést követően (21. ábra).

Feltételezve, hogy normál keratinocitákon hasonló szabályozó mechanizmusok működnek, ezen eredmények arra utalnak, hogy az alkohol fogyasztás következtében megemelkedő szérumban acetón szint megfelelő koncentrációkban valóban képes olyan hatásokat kialakítására, melyek a pikkelysömörös beteg bőrében a tünetek kifejlődésének irányában hatnak.

Korábbi vizsgálatainkban láttuk, hogy a normál bőrtől eltérően a pikkelysömörös tünetmentes bőrben a bazális hámsejtek környezetében szérumban fibronectin jelenléte igazolható. Ezek alapján felmerül az a lehetőség, hogy a pikkelysömörös tünetmentes bőrben a bazális membránban olyan szerkezeti elváltozások vannak, melyek a membrán áteresztőképességét befolyásolva a normál bőrtől eltérően bizonyos, a bőr alatti kötőszövetből származó anyagok bazális hámsejtek környezetébe jutását engedik, ezzel befolyásolva a bazális hámsejt közvetlen sejtkörnyezetét.

Ezt a feltételezést támasztják alá azok a mások által közölt megfigyelések, melyek valóban szerkezeti eltérésre utalnak a normál bőr bazális membránja és a pikkelysömörös tünetmentes bőr bazális membránja között. Leírtak eltérést a laminin 1 szerkezetében, monoklonális ellenanyaggal jelölt normál bőrben a laminin 1 alfa lánc folyamatosan jelenik meg, ettől eltérően a pikkelysömörös tünetmentes bőrben a dermisz papilláinak csúcsánál a festődés megszakad, ezen szakadások alatti területen igen erős fibronectin kifejeződés is megfigyelhető (Mondello és mtsai., 1996; Vaccaro és mtsai, 2002). Más szerzők mind a laminin  $\alpha 2$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$  és  $\gamma 1$  láncok, mind a kollagén IV  $\alpha 1$  és  $\alpha 2$  láncok szakadozottságát,

behajlását és reduplikációját figyelték meg mind tünetmentes, mind tünetes pikkelysömörös bőrben. Ugyanakkor azt is leírták, hogy a pikkelysömörös tünetmentes bőr bazális keratinocitáiban fokozott a mátrix metalloproteináz 2 (MMP 2) enzim kifejeződése (Fleischmajer és mtsai., 2000).



21. ábra

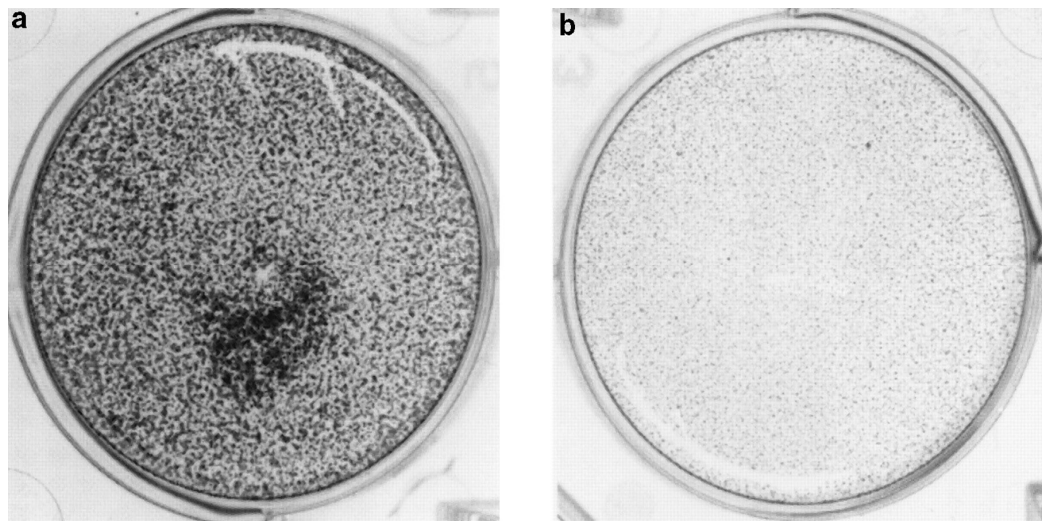
A HaCaT sejteket fél óráig 4,28 mM etanollal és 13,6 mM acetonnal kezeltük, majd a sejtekből 2 órával az etanol és 30 perccel az aceton kezelést követően RNS-t izoláltunk. A PCR reakció termékeit agaróz gélen futtattuk és etidium bromiddal festettük.

5.6.1. Az immunszuppresszív, antipszoriátikus hatású rapamycin (sirolimus) a keratinocita proliferációt *in vitro* gátolja

A rapamycin (sirolimus) egy makrolid immunszuppresszív hatású szer, mely a T sejtek proliferációját blokkolja, ezért feltételezhető volt, hogy a pikkelysömörben hasonlóan más, T sejt aktivációt gátló szerhez (pl. cyclosporin), jó terápiás hatású lehet. Hatásának mechanizmusa eltér a cyclosporin, FK-506 hatásmechanizmusától, ez utóbbi szerek immunszuppresszív hatásukat a calcineurin foszfataz út gátlásán keresztül fejtik ki.

Feltételeztük, hogy a rapamycin sejtciklus blokkoló hatása a keratinocitákon is érvényesülhet, ezáltal szélesebb hatásspektrummal lehet antipszoriátikus, mint azok a szerek, mint például a cyclosporin, melynek az *in vivo* elérhető koncentrációban a keratinocita proliferációra alig van hatása.

Normál bőrből származó keratinociták klonális növekedését a kontrollhoz képest jelentősen csökkentette a 20 nM rapamycin jelenléte a tenyészetben. Annak vizsgálatára, vajon a rapamycin a sejtciklusba belépő, vagy már folyamatosan osztódó sejtekre hat-e, a sejteket különböző időpontokban kezeltük rapamycinnel. A kultúrák egy részéhez mindjárt a tenyésztés elején hozzáadtuk a szert, azt vizsgálándó, vajon a klonogenikus őssejt típusú keratinocita sejtciklusba indukciója gátlódik-e. A tenyészetek másik csoportjához csak a tenyésztés 3. napján adtuk hozzá a rapamycint, ekkor már a sejtek ismételt ciklusokon mennek keresztül *in vitro*. Tapasztalataink szerint a rapamycin mindkét esetben gátolta a sejt kolóniák növekedését (22. ábra).



22. ábra

Normál epidermális sejteket tenyésztettünk az etanol, mint vivőanyag (bal oldali kép, a), valamint 20 nM rapamycin (jobb oldali kép, b) jelenlétében 10 napig. A kialakult kolóniákat formalin fixálás után Nílus késsel és rodaminnal festettük. A kontroll tenyészethez képest (a) a rapamycin kezelt tenyészetben (b) jóval kisebb a sejtkolóniák száma és nagysága.



5.6.2. Az immunszuppresszív, antipszoriátikus hatású rapamycin (sirolimus) a keratinocita őssejtek sejtciklusát a G1 fázisban blokkolja

A keratinocita sejtnövekedés gátlásának mechanizmusát tovább vizsgálva a következőkben megnéztük, hogy a rapamycin hatás hol érvényesül a tenyésztés kezdetén, a keratinocita őssejt típusú sejtek sejtciklusba történő belépésénél. Ezekben a kísérletekben a rapamycint mindjárt a tenyésztés kezdetén hozzáadtuk a sejtekhez, majd a korai kultúrában néztük a  $\beta 1$  integrint erősen kifejező sejtek, illetve a sejtciklus S/G2M fázisában található sejtek arányát (1. táblázat).

A rapamycin kezelés nem befolyásolta a  $\beta 1$  integrint erősen kifejező sejtpopuláció arányát a korai tenyészetben, ugyanakkor a sejtciklus S/G2M fázisában található sejtek számának aránya jelentősen csökkent a kezelt keratinociták esetében (\*-gal jelölve). Ez az eredmény azt bizonyította, hogy a keratinociták sejtciklusának S/G2M előtti blokkolását okozza a szer, anélkül, hogy a sejtek  $\beta 1$  integrin kifejeződésének felerősödését gátolná a tenyészetben.

#### 1. Táblázat

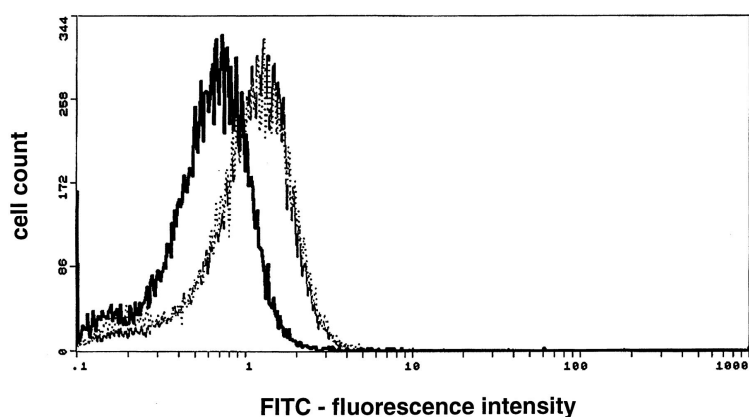
A rapamycin hatása a $\beta 1$ integrin <sup>erős+</sup> sejtek sejtciklusára a korai ex vivo epidermális sejt kultúrákban				
tenyészetek	% $\beta 1$ integrin <sup>erős+</sup>		% S/G2M	
	rapamycin	kontroll	rapamycin	kontroll
1.	43,6	37,1	*18,5	33,8
2.	14,5	11,2	*17,2	30,1
3.	38,2	35,8	*5,8	17,1
4.	53,3	57,8	*24,2	52,5

5.6.3. A rapamycin (sirolimus) keratinocita őssejtekben a proliferálódó sejt nukleáris antigén (PCNA) expressziót gátolja, a D1 ciklin kifejeződést nem befolyásolja *in vitro*

Korábbi vizsgálatainkból tudtuk, hogy a korai *ex vivo* keratinocita tenyészetben a normál bőrben sejtnyugalmi (G0) állapotban levő keratinociták PCNA negatívak. A PCNA a sejtekben a G1 fázis közepén jelenik meg, majd ezt követően kifejeződése gyengül, de az S/G2M fázisban levő sejtekben is kifejeződik. Szerepet játszik a DNS replikációban, kijavításban és a sejtciklus szabályozásában.

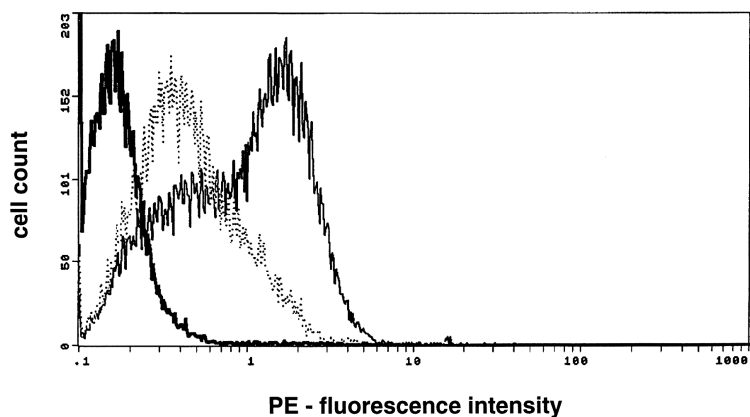
A sejtciklust szabályozó ciklinek közül a D típusúak szintén a ciklus G1 fázisához kötött funkcióval rendelkeznek, blokkolásuk a sejtek osztódását ebben a fázisban állítja le. A D típusú ciklineknek a többi ciklintől eltérően 3 izoformája ismert (D1, D2 és D3), a különböző D ciklin izoformák kifejeződése különbözik az egyes sejt típusokban. Saját vizsgálatainkból tudjuk, hogy a keratinociták mindhárom izoformát kifejezik, egyelőre nem publikált eredményeink szerint a D1 típusú forma megjelenése a G0-G1 tranziton áthaladó keratinocitákra jellemző, míg a folyamatosan osztódó, tehát a G0 quiescent fázist kihagyó, keratinocitákban a másik két izoforma megjelenése dominál.

A korai *ex vivo* keratinocita kultúrákban a rapamycin kezelés hatása a ciklin D1 megjelenését nem befolyásolta a sejtekben (23. ábra), ugyanakkor a PCNA kifejeződés jelentős csökkenését észleltük (24. ábra). Ezek alapján megállapítottuk, hogy a rapamycin a normál őssejt típusú keratinocitákban a PCNA kifejeződés gátlásával blokkolja a sejtek ciklusát a G1 fázisban.



23. ábra

Az ábrán 72 óráig rapamycin és etanol jelenlétében tenyésztett epidermális sejtek ciklin D1 monoklonális ellenanyaggal festett áramlásos citometriás analízise látható. A vastag vonal az izotípus kontroll fluoreszcenciás görbéje, a vékony és pontozott vonal a ciklin D1 specifikus ellenanyaggal jelölt sejtek fluoreszcenciáját mutatja. A rapamycin és az etanol kezelt sejtek között a ciklin D1 fluoreszcenciában nincs különbség. (Egy reprezentatív kísérlet eredménye.)



24. ábra

Az ábrán 72 óráig rapamycin és etanol jelenlétében tenyésztett epidermális sejtek PCNA monoklonális ellenanyaggal festett áramlásos citometriás analízise látható. A vastag vonal az izotípus kontroll fluoreszcenciás görbéje, a vékony és pontozott vonal a ciklin D1 specifikus ellenanyaggal jelölt sejtek fluoreszcenciáját mutatja. A rapamycin kezelt sejtekben a PCNA kifejeződés (pontozott vonal) jelentősen csökkent az etanol kezelt sejtek PCNA kifejeződéséhez (vékony vonal) képest. (Egy reprezentatív kísérlet eredménye.)

## 6. Megbeszélés

### A hám osztódó sejtjei

Vizsgálataink a pikkelysömör betegség pathomechanizmusában szerepet játszó folyamatok megértésére irányultak. A léziós bőrtünet hisztopatológiai elváltozását szem előtt tartva, elsősorban a betegségre oly jellegzetes hám hiperproliferáció kialakulásának mechanizmusait próbáltuk megérteni. Kezdeti kutatásaink a pikkelysömörös hámproliferáció kóros voltának pontosabb megértésére irányultak. Új technikákat kidolgozva az epidermisz sejtjeit multiparaméteres áramlásos citometriás analízissel vizsgálva megállapítottuk, hogy az elszarusodó fedőhámban minden osztódni képes sejtre jellemző a  $\beta 1$  integrin kifejeződés, ugyanakkor a hám proliferatív sejtpopulációi a  $\beta 1$  integrin és a keratin1/10 (K1/K10) kifejeződés alapján két jól meghatározható csoportra oszthatók. Az *in vivo* epidermiszben legbazálisabban elhelyezkedő,  $\beta 4$  integrint kifejező sejtek  $\beta 1$  integrin pozitívak, de nem fejezik ki a keratin 1/10-et. Ezek a sejtek normál körülmények között alig osztódnak, PCNA negatívak. A bazális membránról elemelkedő, K1/K10-et már kifejező sejtek, melyek a  $\beta 1$  integrin kifejeződést még nem veszítették el, erősen proliferálódó sejtek. Ezek az általunk áramlásos citometriás módszerrel karakterizált sejtpopulációk az alkotó sejtek mérete és citoplazmájuk összetettsége alapján megfeleltek a mások által korábban ezen morfológiai tulajdonságokkal jellemzett, különböző proliferatív hámsejteknek (Lavker and Sun, 1982).

### A pikkelysömörös hámsejtek hiperproliferációja

A normál és a pikkelysömörös tünetes epidermisz összehasonlításakor kiderült, hogy a pikkelysömörös epidermisz hiperproliferatív sejtcsoportja a normál bőrben alig osztódó (G0 sejtnyugalmi fázisban levő) keratinocita őssejt típusú sejt ( $\beta 1$  integrin<sup>+</sup> K1/K10<sup>-</sup>) (Bata-Csörgő és mtsai., 1993).

Normál bőrből származó korai *in vitro* sejt kultúrákban 1 % FBS jelenlétében tenyésztve a sejteket azt tapasztaltuk, hogy ez a sejtpopuláció alapozza meg az *in vitro* hámsejt kolóniákat. A tenyésztés elindítását követő

napokban (3-4 nap) a tenyészetben megjelenő osztódó sejtek mind K1/K10 negatív sejtek, ezek a sejtek erősen kifejezik a  $\beta 1$  integrint, PCNA pozitívvá válnak, valamint D1 ciklint fejeznek ki (áthaladnak a sejtciklus G0-G1-S fázisán) (Bata-Csörgő és mtsai., 1995; Bata-Csörgő és mtsai., 1996; Javier és mtsai., 1997). Mind a PCNA, mind a D1 ciklin kifejeződése *de novo* szintézist igényel, a  $\beta 1$  integrin erős kifejeződést feltehetően a glikolizáció foka határozza meg (Kim és mtsai., 1992).

A PCNA jellemzően a G1 fázisban jelenik meg a sejtekben, a gén expresszióját az E2F transkripció faktor szabályozza (Lee és mtsai., 1995). A PCNA blokkolása megakadályozza a sejtek S fázisba jutását (Jaskulski és mtsai., 1988; Liu és mtsai., 1989). A ciklinek specifikus enzimjeikkel (ciklin dependens kinázok (cdk)) univerzális sejtciklus regulátorok. Míg a cdk-ok szintje általában nem változik a sejtciklus során, a ciklinek expressziója a sejtciklus periódusainak megfelelően transzkripció és poszttranszkripció mechanizmusok által szabályozva periodikusan változik (Coqueret, 2002). A D típusú ciklinek a sejtek G0/G1-S tranzitját szabályozzák (Dowdy és mtsai., 1993; Pines, 1995; Sherr, 1993).

Konfluens kultúrában a tenyészet osztódó sejtjei jórészt már K1/K10<sup>+</sup> sejtek, jelezve, hogy az *in vitro* környezetben a sejtek differenciálódni kezdtek. A kezdeti D1 kifejeződést a tenyésztett hámsejtekben a gyors egymásutánban történő osztódás (G1-S-G2/M) során a D2 ciklin kifejeződés dominanciája váltja fel, ami arra utal, hogy a D1 izotípusú ciklinnek keratinocitákban a sejtciklus G0-G1 fázisában specifikus szerepe van (Bata-Csörgő és mtsai., 1996).

Kezünkben volt tehát egy olyan sejt kultúra modell, melyben a sejt nyugalmi fázisban (G0) levő őssejt típusú ( $\beta 1$  integrin pozitív, K1/K10<sup>-</sup>, PCNA<sup>-</sup>) hámsejtek sejtciklusba való indukcióját lehet vizsgálni. Mivel a pikkelysömörös léziós epidermiszben éppen ezeknek a normálisan nyugvó (G0 fázisú) állapotban levő keratinocita őssejteknek a fokozott proliferációja észlelhető, ez a sejt kultúra modell alkalmasnak bizonyult olyan sejt környezeti hatások vizsgálatára, melyek feltételezhetően szerepet játszanak a pikkelysömörös lézióban kialakuló keratinocita hiperproliferáció kialakításában és fenntartásában.

## A T sejtek szerepe a pikkelysömörös hámphiperproliferáció kialakításában

A modell segítségével megállapítottuk, hogy a pikkelysömörös bőrt infiltráló T sejtek aktivált állapotban olyan limfokin környezetet képesek teremteni a bazális hámsejtek számára, mely a pikkelysömörös tünetmentes keratinocitákat a normál hámsejtektől eltérően, fokozott sejtciklus indukcióra kényszeríti. Specifikáltuk a hatásért felelős limfokin környezet összetételét,  $\gamma$ IFN+GM-CSF+IL-3, valamint megállapítottuk, hogy bár a  $\gamma$ IFN kritikus komponense e sejtnövekedés indukciójának, önmagában a hatást nem képes kifejteni, mind a GM-CSF, mind az IL-3 jelenléte szükséges. Vizsgálataink azt is igazolták, hogy a pikkelysömörös epidermiszben *in vivo* a  $CD3^+$  T sejtek  $\gamma$ IFN-t termelő, Th1 típusú sejtek (Szabó és mtsai., 1998). Pikkelysömörös betegek perifériás vérében szignifikánsan csökkentnek találtuk a  $CD3^+ CD56^+$  NK T sejtek arányát, ez, a kezelés során a betegek tünetmentessé válásával sem normalizálódott (Koreck és mtsai., 2002). Hasonló jelenség más Th1 dominanciájú autoimmun betegségben is megfigyelhető, arra utalva, hogy a pikkelysömörben kialakuló gyulladás hátterében kóros immunregulációs mechanizmusok állhatnak (Falcone és mtsai., 1999; Mieza és mtsai., 1996; Sugiyama és mtsai., 2005).

Vizsgálataink egyrészt megerősítették a T sejtek szerepének fontosságát a betegség kialakulásának mechanizmusában, másrészt felhívták a figyelmet arra, hogy a pathomechanizmusban a keratinocita normálistól eltérő válasza is szerepet játszik. A T sejt limfokinek hatására kialakuló, a normálistól eltérő, fokozott sejtciklus indukciós válasza a tünetmentes pikkelysömörös bőr összejt típusú hámsejtjeinek az *ex vivo* korai tenyészetekben, jelezheti e sejtek genetikusan determinált inherens különbözőségét a normál sejtektől, de jelezheti azt is, hogy a pikkelysömörös tünetmentes bőrben ezek a sejtek olyan, a normálistól eltérő sejtkörnyezetben vannak tartósan, mely reakciókészségüket befolyásolja.

## **Az extracelluláris mátrix szerepe a pikkelysömörös hámphiperproliferáció kialakításában**

A sejtek növekedését a szolubilis faktorokon kívül az extracelluláris tér anyagai is erősen befolyásolják. Az extracelluláris matrix anyagaival érintkező sejtfelszíni molekulák közül az integrinek a hámszövetben is jelentős szerepet játszanak a szöveti homeosztázis biztosításában. A sejt-mátrix és a sejt-sejt interakciókon keresztül szabályozzák a sejt tapadását, szétterülését, vándorlását, növekedését és differenciációját (Watt és Hertle, 1994). Fiziológias körülmények között az epidermisz bazális sejtjei nem érintkeznek fibronectinnel, azonban sebzést követően a sejtkörnyezet fibronectinben gazdaggá válik, a sejteken megjelenik az egyébként alig kifejeződő fibronectin receptor, az  $\alpha 5 \beta 1$  integrin és a keratinociták fokozott proliferációval biztosítják a sebgyógyulást.

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a normál bőrtől eltérően a pikkelysömörös tünetmentes bőrben az epidermisz bazális sejtjei körül plazma fibronectin mutatható ki. Áramlásos citometriás vizsgálattal azt is igazoltuk, hogy az  $\alpha 5$  integrin a pikkelysömörös tünetmentes bőr sejtjein jóval erősebben kifejeződik, mint normál sejteken. *In vitro* vizsgálataink szerint a sejtkörnyezetben jelenlevő fibronectin potenciálja a T sejt limfokinek pikkelysömörös tünetmentes keratinocita őssejtekre kifejtett sejtciklus indukciós hatását (Bata-Csörgő és mtsai., 1998). Ismert, hogy az extracelluláris mátrix komponensei képesek szolubilis faktorok hatásait felerősíteni. Heparan szulfát INF $\gamma$ -át, IL-3-at és GM-CSF-t is képes megkötni, a kötés következtében olyan konformációs változások alakulhatnak ki a szolubilis molekulákon, melyek például hatékonyabb receptor kötést eredményeznek (Lortat-Jacob és mtsai., 1991; Lortat-Jacob és Grimaud, 1991; Lortat-Jacob és Grimaud, 1992; Roberts és mtsai., 1988). A tünetmentes bőr bazális hámsajtjeinek környezetében a normál bőrtől eltérően nemcsak plazma fibronectin, hanem feltehetően a hámsajtjei által termelt EDA<sup>+</sup> celluláris fibronectin is kimutatható (Széll és mtsai., 2004; Ting és mtsai., 2000). A pikkelysömörös tünetmentes keratinociták abban is különböznek a normál keratinocitáktól, hogy aktivációs ingerre gyorsabban kifejezik a fibronectin EDA<sup>+</sup> izotípusát (Széll és mtsai., 2004).

## **A hám bazális membránja pikkelysömörben**

Mivel úgy tűnik, hogy a normál bőrben a dermisz epidermisz között elhelyezkedő intakt bazális membrán megakadályozza a plazma fibronektin bejutását a bazális hámsejtek környezetébe, feltételezhető, hogy a pikkelysömörös tünetmentes bőrben a bazális membrán nem intakt, ezért juthat plazma fibronektin a bazális hámsejtek környezetébe.

Valóban vannak adatok arra vonatkozóan, hogy a tünetmentes pikkelysömörös bőr bazális membránjának szerkezete eltér a normál bőrtől. Normál bőrben a laminin 1 alfa lánc folyamatosan jelenik meg a bazális membrán területén, míg a pikkelysömörös tünetmentes bőrben a dermisz papilláinak csúcsánál szakadások észlelhetők, a szakadások alatti területen igen erős fibronektin kifejeződés is megfigyelhető (Mondello és mtsai., 1996; Vaccaro és mtsai., 2002). Más szerzők mind a laminin  $\alpha 2$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$  és  $\gamma 1$  láncok, mind a kollagén IV  $\alpha 1$  és  $\alpha 2$  láncok szakadozottságát, behajlását és reduplikációját figyelték meg mind tünetmentes, mind tünetes pikkelysömörös bőrben. Ugyanakkor azt is leírták, hogy a pikkelysömörös tünetmentes bőr bazális keratinocitáiban fokozott a mátrix metalloproteináz 2 (MMP-2) enzim és az ezt gátló TIMP-2 (tissue inhibitor of MMP-2) kifejeződése (Fleischmajer és mtsai., 2000).

Ismert az is, hogy nem csak a tünetes pikkelysömörös bőrben, hanem a tünetmentesben is csökkent a kapillárisok rezisztenciája (Barton és mtsai., 1992; Hern és mtsai., 2005; Kemény és mtsai., 1988), ami a szuperficiális kapillárisok áteresztőképességét növeli.

Synoviális sejtekben és chondrocitákban kimutatták, hogy az EDA<sup>+</sup> fibronektin jelenléte a sejt környezetben a sejtekben IL-1 $\alpha$  és IL-1 $\beta$  kifejeződést indukál. Az IL-1 indukción keresztül pedig MMP-1 fejeződik ki a sejtekben (Saito és mtsai., 1999).

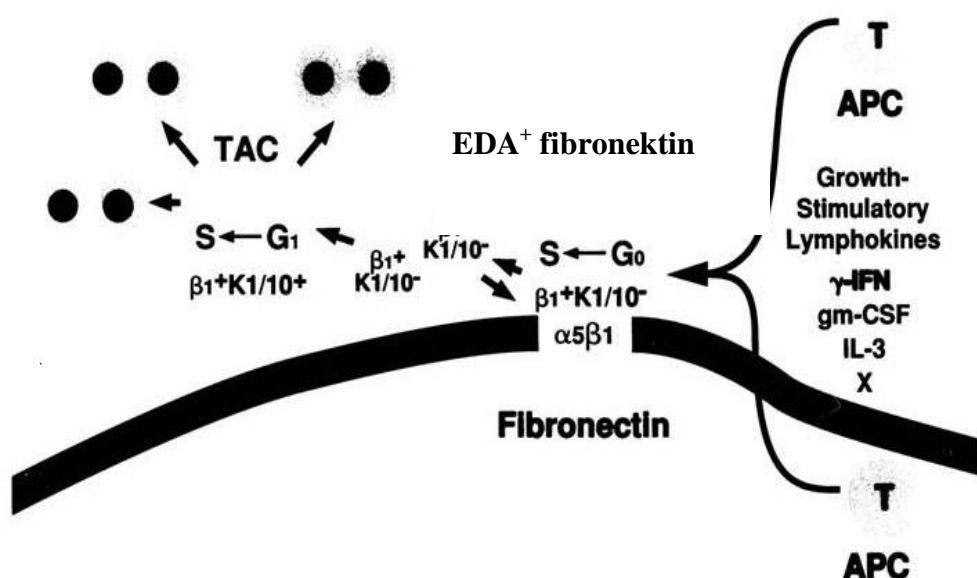


A pikkelysömörös tünetmentes epidermisz bazális hámsejtjének környezetében kórosan jelen levő fibronectin felelős lehet a sejtek fokozott  $\alpha 5$  integrin kifejeződéséért. Ismert, hogy a fibronectin képes receptorának kifejeződését és funkcióját befolyásolni (Delcommenne és Streuli, 1995; Huang és mtsai., 1994; Pietenpol és mtsai., 1990). Az  $\alpha 5$  integrin egység a MAPK (mitogén aktivált foszfo-kináz) jelátviteli rendszeren keresztül képes autoregulálni kifejeződését az extracelluláris fibronectin koncentrációtól függően. Cornea epithel sejtekben leírták, hogy az ECM fibronectin komponense az  $\alpha 5$  integrin gén promoterét az Sp1 transzkripció faktoron keresztül pozitívan befolyásolja (Larouche és mtsai., 2000).

A fent vázolt eltérések alapján a pikkelysömör pathomechanizmusában szerepet játszó faktorokat a 25. ábra mutatja. A pikkelysömörös tünetmentes hám keratinocita őssejt típusú sejtjei ( $\beta 1$  integrin<sup>+</sup> K1/10<sup>-</sup> stem sejtek) folyamatosan fibronectin gazdag környezetben vannak. A fibronectin gazdag környezet alkotója részben a nem tökéletes szerkezetű bazális membrán felől érkező szérum fibronectin, részben a keratinociták által termelt EDA<sup>+</sup> celluláris fibronectin. A fibronectin hatás következtében a sejtek folyamatosan  $\alpha 5$  integrint fejeznek ki. Az  $\alpha 5$  integrinen keresztül a sejtek D1 ciklin kifejeződését erősítő jel érkezik a hámsejtekben. Az egyébként nyugvó (G0) fázisú keratinocita őssejtek sejtciklus indukcióját a G0-G1-S átmenetnél a D1 ciklin kifejeződése jellemzi.

A sejtkörnyezeti fibronectin hatás felerősíti a bőrben aktiválódó Th1 sejtek által termelt limfokinek keratinocita őssejt proliferációt okozó hatását. A  $\beta 1$  integrin<sup>+</sup> K1/K10<sup>-</sup> keratinociták osztódása feltehetően aszimmetrikus. A sejtek egy része újraképi önmagát ( $\beta 1$  integrin<sup>+</sup> K1/K10<sup>-</sup> keratinocita őssejt, stem sejt), más része differenciálódni kezd, miközben újabb, folyamatos osztódáson megy keresztül ( $\beta 1$  integrin<sup>+</sup> K1/K10<sup>+</sup> átmeneti osztódó keratinocita, TAC sejt).

25. ábra



Az ábra a pikkelysömörben kialakuló hám hiperproliferáció eredményeink alapján feltételezett mechanizmusát szemlélteti. A vastag vonal a hám bazális membránja, melyen szakadások észlelhetők. A szakadás következtében a bazális membránon ülő keratinocita össejtek környezetébe szérumban fibronectin kerül, mely a sejtek fokozott  $\alpha 5$  integrin kifejeződésében szerepet játszhat. A pikkelysömörös hámsejtek aktivációs jelekre EDA<sup>+</sup> fibronectint fejeznek ki, mely a fokozott  $\alpha 5$  integrin kifejeződéséhez szintén hozzájárulhat. A fibronectinben gazdag sejt-környezet felerősíti a bőrben aktiválódó T sejtek által termelt limfokinek hámsejt proliferációt fokozó hatását, mely a keratinocita össejtek ( $\beta 1$  integrin<sup>+</sup> K1/K10<sup>-</sup>) sejtciklusba való indukciójában nyilvánul meg (G0-G1 átmenet aktiválása).

## Citokinhatások és jelátvitel a pikkelysömörös hámsejtekben

A citokin molekulák közül ismert, hogy jónéhány egyaránt kifejthet sejtnövekedést fokozó vagy sejtnövekedést gátló hatást. A Ba/F3-6 csontvelői eredetű IL-3 dependens pro-B sejtvonalban az IL-3 proliferációt fokozó, a  $\gamma$ INF proliferációt csökkentő hatású. Ha a  $\gamma$ INF STAT-1 jelátviteli útját szelektíven blokkolják, a sejtek növekedését a  $\gamma$ INF ugyanúgy elő tudja idézni, mint az IL-3. Érdekes módon mind az IL-3, mind a  $\gamma$ INF képes c-Myc kifejeződést indukálni, a  $\gamma$ INF esetében anélkül, hogy a STAT-1 jelátviteli út aktiválódna.

A c-Myc protoonkogén pozitívan befolyásolja a sejtnövekedést, blokkolásával a  $\gamma$ INF által okozott sejtnövekedés megszűnik, IL-3 azonban feltehetően a cFOS aktivációval c-Myc gátlás mellett is képes a sejtek növekedését pozitívan befolyásolni (Asao and Fu, 2000). Fiziológiásan a hámsejtek terminális differenciációja során a c-Myc mRNS kifejeződés csökken a sejtekben (Yaar és mtsai., 1993; Younus and Gilchrest, 1992). A TGF $\beta$ 1 a hámsejtek proliferációját a cMyc gátlásán keresztül csökkenti (Alexandrow és mtsai., 1995; Pietenpol és mtsai., 1990), a c-Myc antisense a sejtek proliferációját megakadályozza (Hashiro és mtsai., 1991). Ezek alapján úgy tűnik, hogy a c-Myc a sejtnövekedést a hámsejtekben más sejtekhez hasonlóan pozitívan befolyásolja.

Watt és Gandarillas 1997-es vizsgálataiból kiderült, hogy a c-Myc szelektíven a keratinocita őssejt típusú sejtek működését szabályozza (Gandarillas és Watt, 1997). Ezekben a sejtekben a c-Myc konstitutív aktivációja a sejtek terminális differenciációját eredményezi anélkül, hogy apoptózist indukálna vagy a proliferációt befolyásolná. Vizsgálataik eredményei alapján nem zárható ki, hogy más sejtekhez hasonlóan a keratinocitában is szükséges a c-Myc aktiváció ahhoz, hogy a sejtek sejtciklusban maradjanak, ugyanakkor a c-Myc aktiváció a sejtekben elindítja a terminális differenciálódás programját. Úgy néz ki, hogy a c-Myc szerepet játszik a keratinocita őssejtek átmeneti osztódó sejtekké való alakulásában. A tranzit osztódó sejtekben megindul a hámsejt terminális differenciációja, ugyanakkor a sejtek kifejezetten proliferálódnak.

Az utóbbi években született eredmények szerint pikkelysömörben a tünetmentes bőr hámsejtjeiben a  $\gamma$ IFN STAT-1 jelátviteli út sérült. Mind a STAT-1 $\alpha$ , mind az IRF-1 (interferon regulált faktor 1) csökkent aktivációt mutat a pikkelysömörös tünetmentes hámsejtekben *in vivo* és *in vitro* egyaránt (Jackson és mtsai., 1999).

Nemrég leírták, hogy a hámsejtekben konstitutívan aktív STAT-3-at kifejező transzgenikus egerek bőrén pikkelysömörre emlékeztető elváltozások alakulhatnak ki a bőr sebzése következtében, ugyanakkor arról is beszámoltak, hogy nemcsak a pikkelysömörös lézió hámsejtjeiben, hanem a tünetmentes bőr hámsejtjeiben is, a normális hámsejtektől eltérően igen erős a STAT-3 kifejeződése (Sano és mtsai., 2005). STAT-3 aktivációt számos citokin képes okozni, köztük az IFN $\gamma$  is. Elképzelhető, hogy a folyamatos STAT-3 aktiváció a pikkelysömörös tünetmentes hámsejtekben azért alakul ki, mert a STAT-1 jelátviteli út funkcionálisan sérült, vagy valamilyen állandó hatás következtében blokkolt. A STAT1 deficiens U3A sejtekben a  $\gamma$ IFN sejtnövekedést gátló hatása nem érvényesül, ha azonban a sejteket STAT-1 $\alpha$ -val transzfektálják a  $\gamma$ IFN növekedés gátló hatása visszaáll a sejtekben (Chin és mtsai., 1996).

A STAT-3-at az intracitoplazmikus Janus tirozin kináz (JAK) foszforilálja, a STAT-3 dimerizálódik és a sejtmagba kerül, ahol bizonyos gének transzkripcióját aktiválja. A ciklin D1 gén a STAT-3 egyik target génje. Az elszarusodó laphámkarcinoma sejtvonal YC4-H891, melyben a STAT-3 konstitutívan aktivált, domináns negatív konstrukcióval való transzfekciója a ciklin D1 promoter aktivitását, valamint a ciklin D1 mRNS és fehérje kifejeződést gátolja a sejtekben (Masuda és mtsai., 2002). Fej, nyak eredetű laphámrák sejtekben a STAT-3 gyakran konstitutívan aktivált (Leong és mtsai., 2003).

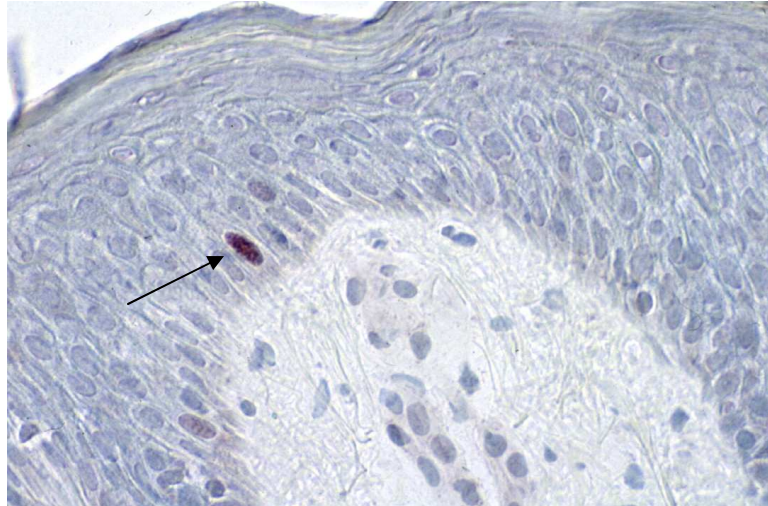
Érdekes, hogy myeloma multiplexben a sejtek STAT-3 aktivációja és a ciklin D1 kifejeződése nem függ össze, ennek magyarázata lehet az, hogy az epitel sejtekkel ellentétben normál plazma sejtek a D1 ciklint nem fejezik ki (Quintanilla-Martinez és mtsai., 2003). Ez is példája a különböző D típusú ciklinek

sejtspecifikus kifejeződésének, melynek oka egyelőre nem ismert. Nem biztos, hogy egyszerű biológiai redundanciáról van szó.

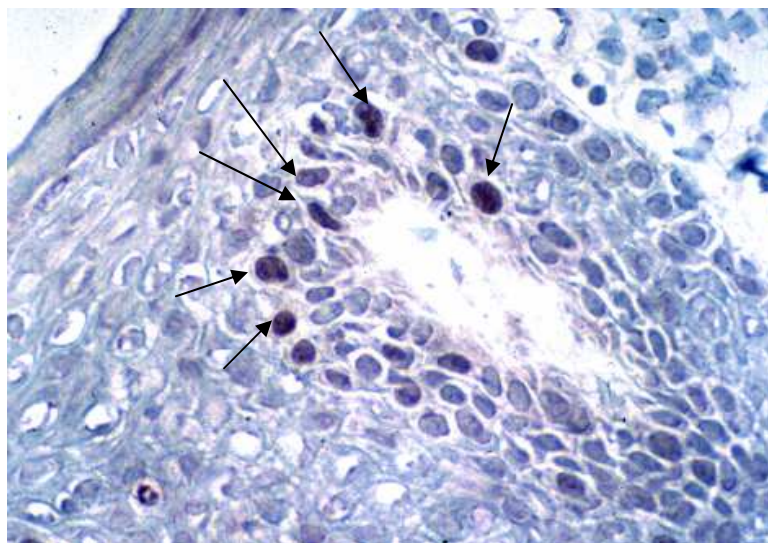
Saját vizsgálataink szerint az összejt típusú hámsejtek G0/G1 ciklusában a D1 ciklin mRNS és fehérje megjelenése dominál a sejtekben, ezzel ellentétben a sejtek ismételt gyors osztódásakor a D1 dominanciáját a D2 mRNS és fehérje fokozott kifejeződése kíséri (Bata-Csörgő és mtsai., 1996). Humán T sejtek sejtnyugalmi fázisból való kilépését követően a korai G1 fázisban a D2 ciklin kifejeződése felerősödik, melyet némi késéssel követ a D3 ciklin kifejeződése a sejtekben, arra utalva, hogy e két D ciklin izotípus más csekkpontoknál játszik szerepet a sejt G1 fázisában (Ajchenbaum és mtsai., 1993).

Ismert, hogy a sejtek integrin mediálta adhéziója az extracelluláris mátrixhoz különböző jelátviteli utakat aktivál. Az Shc, Cbl és foszfolipáz Cg foszforiláció mellett a Ras/Erk és a foszfatidilinozitol 3'-kináz/Akt utakat is aktiválni képes. Az integrin-mátrix kapcsolat az EGFR (epidermális növekedési faktor receptor) részleges aktivációját képes kiváltani integrin dependens és EGFR ligand independens módon. Az EGFR integrin dependens aktivációja következtében kialakuló Erk és Akt aktiváció lehetővé teszi a D1 ciklin adhézio dependens indukcióját a sejtekben exogén növekedési faktorok nélkül is (Bill és mtsai., 2004). Saját vizsgálataink szerint a hámsejtekben az  $\alpha 5$  integrin funkció blokkolása a sejtek adhéziójától függetlenül is képes a sejtek ciklusát és D1 ciklin kifejeződését blokkolni, akkor is, ha a sejt környezetben exogén növekedési faktorok jelen vannak. A D1 ciklin 5 integrinen keresztül történő szabályozásának jelentőségét a pikkelysömörös keratinocita összejt típusú sejtek hiperproliferációjában támogatja az a megfigyelésünk, mely szerint a pikkelysömörös hámlézióban a bazális hámsejtek jóval nagyobb száma fejezi ki a D1 ciklint, mint a normál hámszövetben (26. ábra)

Normál szövet



Pikkelysömörös lézió szövet



26. ábra Míg a normál hámszövetben a bazális hámsejtek között egy dermális papilla területén mindössze 1 db jól festődő D1 ciklin pozitív sejt látszik, addig a pikkelysömörös lézió dermális papilláját 6 db jól festődő ciklin D1 pozitív hámsejt veszi körül.

Eddig két növekedési faktorról mutatták ki, hogy képes a sejtek által termelt fibronectin alternatív hasítását befolyásolni, az egyik a hepatocita növekedési scatter faktor (HGF/SF), a másik a transzformáló növekedési faktor  $\beta$ (TGF $\beta$ ) (Inoue és mtsai., 2001; Li és mtsai., 2000). Mind a TGF $\beta$ 1, mind a TGF $\beta$ 2 növeli az EDA<sup>+</sup> variáns arányát a sejtekben. A TGF $\beta$  a legtöbb sejt növekedését gátolja, HaCaT keratinocitákban kimutatták, hogy a TGF $\beta$  a p15 és a p21 sejtciklus gátló fehérjék szintézisét indukálja. Mindkét fehérje a ciklin dependens kinázok működését gátolja, a p21 a ciklin E+cdk2, valamint a ciklin D1+cdk4 komplexszel kapcsolódik, a p15 a cdk4-et és a cdk6-ot szekvesztrálja (Datto és mtsai., 1995; Reynisdottir és mtsai., 1995).

HaCaT keratinocitákban a TGF $\beta$ 1 direkt indukálja a c-Myc transzkripció faktor antagonista Mad1 kifejeződését, azt is kimutatták, hogy pikkelysömörös tünetes bőrben a Mad1 mRNS szinten emelkedett (Werner és mtsai., 2001). Sebzést követően a normál bőrben emelkedik a TGF $\beta$ 1 szint és a szuprabazálisan elhelyezkedő keratinocitákban felerősödik a Mad1 kifejeződése. In situ hibridizációval mind a TGF $\beta$ , mind a c-Myc kifejeződés azonos a pikkelysömörös léziós és nem léziós epidermiszben (Schmid és mtsai., 1993), a c-Myc léziós epidermiszben való kifejeződése a normál epidermiszben észlelhető kifejeződéstől sem tér el (Elder és mtsai., 1990).

### **A pikkelysömörös hámsejtek differenciálódása**

A pikkelysömörös tünetes bőrben a normál bőrtől eltérően a keratin 1/10 kifejeződés nem jelenik meg a szuprabazális sejtekben, a bazális sejtsor felett még legalább két sorban K1/K10 negatív sejtek helyezkednek el. Ha a c-Myc kifejeződés valóban esszenciális az őssejt típusú keratinocita terminális differenciációjának beindításához, elképzelhető, hogy normális funkció mellett a pikkelysömörös keratinocita hiperproliferáció megjelenését fokozott c-Myc indukció kellene kövesse a szuprabazális sejtekben ahhoz, hogy a terminális differenciáció beinduljon. A terminális differenciáció beindulása egyben gátat vetne a sejtek fokozott proliferációjának is, adatok vannak arra nézve, hogy a keratin 10 direkt sejtproliferációt gátló hatással bír. A keratin 10 ektópiás expressziója a HaCaT sejtekben a sejtek proliferációját gátolja (Paramio és mtsai.,

1999). A keratin 10 kiütése egérben (keratin 10<sup>-/-</sup> egér) a bőr bazális sejtjeiben hiperproliferációt, c-Myc, ciklin D1 indukciót eredményez, ugyanakkor a hámsejtekben megjelenik a hiperproliferatív sejtekre jellemző keratin6/16 (Reichelt and Magin, 2002). Mind az EDA<sup>+</sup> fibronectin jelenléte, mind a Mad1 kifejezettebb expressziója a pikkelysömörös epidermiszben arra utal, hogy fokozott TGFβ hatásnak vannak kitéve a pikkelysömörös hámsejtek.

A szerteágazó vizsgálati eredmények alapján úgy tűnik, hogy a TGFβ a sebgyógyulás során komplex módon befolyásolja a hámsejteket. A Mad1 indukció és az EDA<sup>+</sup> fibronectin termelés pozitív befolyásolásával a sejtek regeneratív folyamatait segíti elő, ugyanakkor amint azt HaCaT keratinocitákon demonstrálták, a sejtek sejtciklusát direkt képes gátolni. A bőr normálisan zajló sérüléseit követő regeneratív aktivációs mechanizmusokat a megfelelő helyen és időben jelentkező komplex gátló mechanizmusok a sebgyógyulás fázisainak megfelelően leállítják. A pikkelysömörben jelentkező kóros aktivációs folyamatok, melyek sok tekintetben hasonlítanak a normál sebgyógyulás során észlelhető aktivációs folyamatokhoz, negatív szabályozása feltehetően több ponton sérült.

A TGFβ termelése sebgyógyulás során főleg a fibroblasztokhoz kötött. Pikkelysömörben arra is van evidencia, hogy a fibroblasztok viselkedése is eltér a normálistól. Pikkelysömörös bőrből származó *in vitro* tenyésztett fibroblasztok szolubilis faktorok révén normál keratinocitákat fokozottabb proliferációra késztetnek szintén *in vitro* tenyészetben, mint a normál bőrből származó tenyésztett fibroblasztok (Krueger and Jorgensen, 1990). A pikkelysömörös bőr fibroblasztjaiban a normál bőr fibroblasztjaihoz képest eltérést találtak a MAPK jelátviteli út aktivációjában különböző ingerekre (Dimon-Gadal és mtsai., 1998). Fibroblaszt-keratinocita együttes tenyésztésekor az INFγ a keratinociták fokozott proliferációját idézte elő, de csak a pikkelysömörös beteg bőréből származó sejteken, egészséges bőrből származó sejteken nem (Fransson és mtsai., 1996).



Nemrég egy amerikai-angol munkacsoport *in vitro* bőr ekvivalenseket hasonlított össze normál bőrből származó és pikkelysömörös tünetmentes bőrből származó sejtek esetében (Barker és mtsai., 2004). A bőr ekvivalens tenyészet lényege általában az, hogy extracelluláris mátrixszal bevont membránon fibroblasztokat tenyésztnek, majd az egyrétegű tenyésztett fibroblasztokra ráteszik az addig külön tenyésztett keratinocitákat. A membránt a sejtekkel úgy helyezik el a tenyésztőedényben, hogy a keratinociták felszínét levegő érje, természetesen a sejtek a membrán felől tápfolyadékban vannak. Az ilyen levegő-folyadék tenyészet többrétegű hámot eredményez. Mind a normál, mind a pikkelysömörös bőrből származó sejtek a második, harmadik passzálást követően kerültek a bőr ekvivalens tenyészetekbe, tehát a sejtek elég távol voltak eredeti, *in vivo* környezetüktől. A pikkelysömörös sejtekből kialakult bőrben a hámsejtek szignifikánsan fokozott proliferációját lehetett látni Ki67 festéssel. Míg a normál bőr ekvivalensben a hámsejtekben nem lehetett TNF $\alpha$ -át és IFN $\gamma$ -át kimutatni, addig a pikkelysömörös bőr ekvivalens hámsejtjei mindkét citokint igen erősen kifejezték. A hámsejtek IL-6 kifejeződésében nem mutatkozott különbség. Mind az IL-8, mind a Gro- $\alpha$ , valamint az IL-8 receptor CXCR2 kifejeződése szignifikánsan emelkedett a pikkelysömörös bőr ekvivalensben a normálhoz képest.

Ezek az eltérések mind olyan elemei a betegségnek, melyek pathomechanizmusban játszott szerepe korábbi vizsgálatok alapján is erősen felmerült. A TNF $\alpha$  hatás blokkolása a bőrtünetek, de még inkább az ízületi panaszok kezelésében hatékony. Érdekes, hogy a  $\gamma$ IFN-t maguk a hámsejtek is termelik a betegség *in vitro* modelljében. Bár valószínű, hogy a tünetek kialakításában szerepet játszó T sejtek a  $\gamma$ IFN fő termelői a beteg bőrben, nem zárható ki, hogy a betegség kialakulására való fokozott hajlam kialakításában a hámsejtek által termelt  $\gamma$ IFN is szerepet játszik. A CXCR2/IL-8/Gro- $\alpha$  pathomechanizmusban játszott szerepe szintén régóta vizsgálat tárgyát képezi pikkelysömörben, tekintettel arra, hogy az *in vivo* tünetes bőrben igen erős ezek kifejeződése (Kemeny és mtsai., 1994). A legújabb vizsgálatok szerint az IL-1 $\alpha$  fokozott IL-8 kifejeződést idéz elő keratinocitákban és ezen keresztül a sejtek

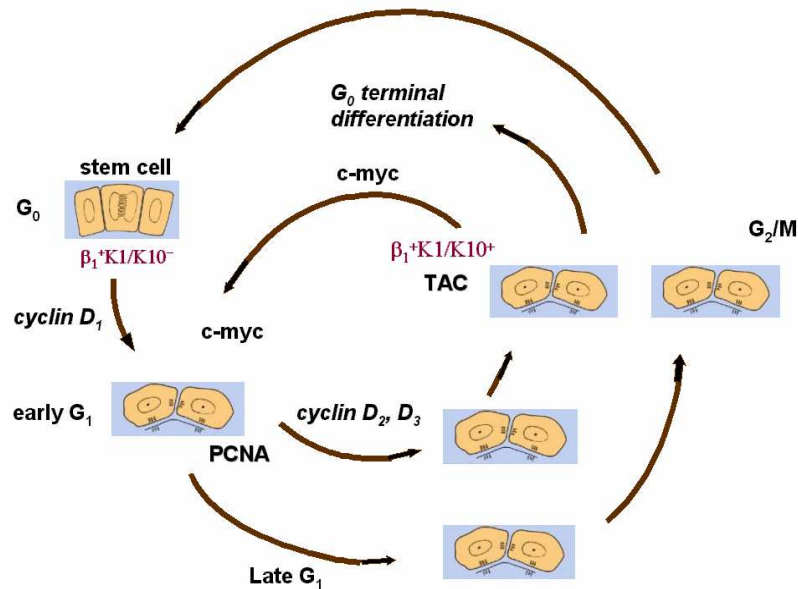
növekedése fokozódik. Az IL-1 $\alpha$  által előidézett sejtnövekedést fokozó hatást a CXCR2 blokkolásával meg lehet akadályozni, ami azt jelzi, hogy a hatás az IL-8-on keresztül érvényesül (Steude és mtsai., 2002).

Saját áramlásos citometriás eredményeink szerint a hámsejtekben az IL-1/IL-1RA kifejeződés elsősorban a hám átmeneti osztódó (TAC) sejtpopulációjához kötött. Ebben a sejtpopulációban a hámsejtek differenciálódásuk szempontjából lényeges változáson mennek keresztül, a sejtek már a terminális differenciáció első lépésének, a keratin 1/10 kifejeződésnek lépését megtették, gyors egymásutánban proliferálódnak, majd az aktív sejtciklusból kilépve senescens nyugalmi állapotba kerülnek. A proliferatív kapacitás elvesztésével együttjár  $\beta$ 1 integrin kifejeződésük elvesztése. A hámsejtek IL-1 termelésének regulációja és a sejtek differenciálódása közötti kapcsolatról nem sokat tudunk, de elképzelhető, hogy e két folyamat szorosan kapcsolódik a hámsejtekben.

A hámsejtek természetes immunitásban játszott szerepét szolgáló különböző funkciókról ismert, hogy a sejtek differenciálódásához kapcsoltak, saját eredményeink szerint mind a Toll 2, 4 receptorok, mind a keratinocita mannóz receptora a differenciálódott hámsejteken fejeződik csak ki (Pivarcsi és mtsai., 2004; Szolnoky és mtsai., 2001). Az IL-1 $\beta$  kifejeződésben általunk észlelt különbség a normál és pikkelysömörös léziós hámsejtek között jelezheti a sejtek kóros differenciálódását, melynek oka a sejtkörnyezeti regulációs mechanizmusok vagy a sejtek inherens, genetikusan determinált hibája is lehet. A sejtkörnyezeti regulációs mechanizmusok kóros voltára utal az az általunk leírt tény, hogy a pikkelysömörös hámiban a bazálisan elhelyezkedő sejtek környezete szérumból eredetű fibronektint tartalmaz. HaCaT sejteken láttuk, hogy a szérumból hatása a hámsejtek  $\alpha$ 5 integrin kifejeződését fokozza, egyúttal a keratin 1 kifejeződést gátolja. Azt is láttuk, hogy az  $\alpha$ 5 integrin fokozott kifejeződése a sejtek proliferációjának serkentése irányában hat, a keratin 1/10 kifejeződés ezzel ellentétben a sejtproliferációt negatívan befolyásolja. Elképzelhető tehát, hogy a pikkelysömörös hám bazális sejteinek szérumból környezete fokozza a sejtek proliferációra való hajlamát, ugyanakkor a sejtek differenciálódását késlelteti.

A 27. ábrával szemléltetem a vizsgálatok alapján feltételezhető keratinocita sejtciklus néhány leegyszerűsített jellemzőjét.

27. ábra



Az összejt típusú sejtek ( $\beta_1$  integrin<sup>+</sup> K1/K10<sup>-</sup>) G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>-S áthaladásakor a D1 típusú ciklint fejezik ki, majd megjelenik a sejtekben a PCNA. Azok a sejtek, melyekben a c-Myc indukció bekövetkezik differenciálódni kezdenek, megjelenik bennük a keratin1/10 ( $\beta_1$  integrin<sup>+</sup> K1/K10<sup>+</sup>). A c-Myc kifejeződés hiányában a sejtek differenciációja nem következik be, nem fejezik ki a keratin1/10-et. A nem differenciálódó sejtek a G<sub>2</sub>/M fázist követően ismét G<sub>0</sub> sejtnyugalmi fázisba kerülnek. A c-Myc indukció a sejtekben egyrészt a differenciálódás irányában hat, másrészt a sejteket fokozott proliferációra készíti, ezek a  $\beta_1$  integrin<sup>+</sup> K1/K10<sup>+</sup> sejtek a G<sub>2</sub>/M fázist követően ismét osztódni kezdenek, ekkor a G<sub>1</sub> fázisban jellemzően D2 és D3 ciklint fejeznek ki. Amikor a differenciálódó gyors egymásutánban osztódó TAC keratinociták elveszítik  $\beta_1$  integrin pozitivitásukat, kikerülnek a sejtciklusból és a G<sub>0</sub> terminális nyugalmi fázisba kerülve további sejtosztódásra képtelenné válnak. A keratinociták proliferációjuk és differenciálódásuk során alapvetően kétirányban mozognak, lefele a bazális

membrán fele vagy felfele a bazális membrántól távolodva. Feltételezhető, hogy a bazális membrán felől érkező jelek meghatározóak a sejtek viselkedésére. Pikkelysömörben a keratinocita őssejtek ( $\beta 1$  integrin<sup>+</sup> K1/K10<sup>-</sup>) fokozottan osztódnak, jóval több a D1 ciklint kifejező sejt a bazális hámsejtek között. A pikkelysömörös hámsejtek fokozott osztódásában az is meghatározó lehet, hogy inherens módon vagy a külső környezet által szabályozva a c-myc hatás elégtelensége miatt a keratinocita őssejtek differenciálódása késleltetett, ami végső soron egy átmeneti proliferatív fázist követően a sejtek proliferációját leállítaná.

### **Az alkohol hatása pikkelysömörben**

A fokozott alkoholfogyasztás pikkelysömört provokáló szerepe a klinikai gyakorlatban általánosan elterjedt hit, mellyel kapcsolatban alig van vizsgálati adat (Gupta és mtsai., 1993; Higgins és du Vivier, 1994; Monk és Neill, 1986; Vincenti and Blunden, 1987). HaCaT keratinocitákon tett megfigyeléseink, miszerint az aceton és az etanol a keratinociták proliferációját megfelelő koncentrációkban fokozni képes, alátámasztja annak lehetőségét, hogy az erős alkoholfogyasztás következtében a vérben megemelkedő aceton szint a pikkelysömörben fokozottan áteresztő érfalon és bazális membránon átjutva a keratinocitákat proliferációra serkenti és ezzel valóban hozzájárul a betegség provokálásához.

### **A rapamycin (sirolimus) új terápiás lehetőség pikkelysömörben**

A rapamycint az 1960-as években izolálták a *Streptomyces hygroscopicus*-ból melyet a Húsvéti Szigetéről származó földmintából nyertek. Eredetileg antimikotikus hatását vizsgálták, majd kiderült, hogy immunszuppresszív hatással rendelkezik, a T sejtek proliferációját gátolja. Az immunofilinnel komplexet képezve a sejtek citoplazmájában a TOR (target of rapamycin) proteinhez kötődik, ezek a TOR proteinek erősen konzervált kinázok, melyek a sejt ciklusának kontrollját szabályozzák, külső növekedési faktor receptorokon érkező jelekre (Crespo és Hall, 2002).

Transzláció gátló, transzlációt iniciáló fehérjéket és a riboszómális S6 kináz működését szabályozzák. Saját eredményeink szerint a D1 ciklin kifejeződést nem befolyásolják keratinocitákon, de a PCNA *de novo* szintézisét blokkolják, melynek következtében a sejtek ciklusa a G1 fázisban leáll. A szer hazánkban is regisztrált szervtranszplantált betegek immunszuppressziójára, indikációs területen kívüli használatáról elsősorban gyulladásos bőrbetegségekből számolnak be (Reitamo és mtsai., 2001), bár újabban intenzíven vizsgálják a rapamycin különböző tumorok kezelésében tapasztalható hatásait, illetve tekintettel arra, hogy a rapamycin a simaizomsejtek proliferációját is gátolja, vizsgálják az artériás stent behelyezést követő érújraelzáródás megelőzésében való alkalmazhatóságát (Easton és Houghton, 2004).

Bár a pikkelysömör betegség pontos pathomechanizmusa nem ismert, az utóbbi egy-két évtized kutatási eredményei máris új terápiás lehetőségeket teremtettek a betegség gyógyításában. A betegség pathomechanizmusában szerepet játszó faktorok felderítése elengedhetetlen feltétele a specifikusabb, hatékony, kevesebb mellékhatást okozó terápiák megtervezésének. Saját eredményeink is hozzájárultak annak bizonyításához, hogy a pikkelysömörben az aktivált T sejteknek fontos szerepe van.

A közepes és súlyos fokú pikkelysömör terápiájában számos új biológiai szer alkalmazását kezdték el az utóbbi években, elsősorban az Egyesült Államokban (Dubin és mtsai., 2003). Ezek a szerek specifikus immunfolyamatok gátlására tervezettek, néhányat kifejezetten a pikkelysömör kezelésére fejlesztettek ki. Biztonságos alkalmazhatóságuk szempontjából a legtöbb klinikai tapasztalat a TNF gátlókkal (etanercept, infliximab) van, mivel rheumatoid arthritisben és autoimmun gyulladásos bélbetegségekből (Crohn betegség) is alkalmazzák őket, ezekben az indikációkban hazánkban is törzskönyvezték (Enbrel, Remicade).

Közepes és súlyos pikkelysömör betegség kezelésére törzskönyvezték az Egyesült Államokban az alefacept (Amevive), egy LFA-3 fúziós protein (a leukocita funkció asszociált antigén-3 és az IgG1 molekula Fc része fuzionálva). Intramuszkuláris vagy intravénás injekció formájában alkalmazható, a bőrt infiltráló T sejtek CD2 (LFA-3) receptorához kötődve megakadályozza a sejtek

aktivációját. Az eddigi vizsgálatok alapján a kezelés biztonságos, bizonyos esetekben egy 3 hónapos kúrával a pikkelysömör betegség több hónapos remisszióját lehet elérni a betegeknél. Folyamatban vannak azok a klinikai vizsgálatok, melyekben a hosszabb idejű fenntartó kezelés hatékonyságát és biztonságosságát követik nagyobb beteganyagon. A T sejtek CD11a receptorához kötődve a humanizált monoklonális ellenanyag efalizumab (Raptiva) a T sejtek bőrbe jutását gátolja, így módon hatékony a pikkelysömör bőrtüneteinek kezelésében. A betegek egy részénél a terápia befejezését követően a betegség súlyosabb recidíváját észlelték (rebound effektus).

Az utóbbi években egyre több, régóta alkalmazott antipszoriátikus hatású terápiáról derült ki, hogy a Th1-es típusú immunválaszt visszaszorítja, ami feltehetően hozzájárul a betegségben tapasztalt jó terápiás effektushoz. Ilyenek a különböző fénykezelések (UV-B, PUVA), a methotrexat, a retinoidok, a D3 vitamin analógok, a fűmársav észterek, ez utóbbi csak Németországban regisztrált a betegség kezelésére (Ghoreschi és mtsai., 2003).

## 7. Összefoglalás

Munkám a pikkelysömör betegség bőrelváltozásának egyik fontos eltérésének, a hámsejtek fokozott proliferációjának kiváltásában szerepet játszó lehetséges mechanizmusok vizsgálatára irányult. Korábbi saját eredmények bizonyították, hogy a betegségben a hámsejt hiperproliferáció a normál bőrben alig osztódó, keratinocita őssejt típusú, germinatív sejtpopulációhoz kötött. Ezek a sejtek  $\beta 1$  integrint kifejező, keratin 1/ keratin 10 negatív sejtek, fiziológias körülmények között a normál bőrben ezen sejtek nagy része sejtnyugalmi állapotban van. Ezzel ellentétben a pikkelysömörös lézióban ezek a sejtek igen intenzív proliferatív aktivitást mutatnak. Korábbi saját vizsgálataink azt is igazolták, hogy a pikkelysömörös bőrből klónozott és *in vitro* aktivált T sejtek felülűszója a pikkelysömörös tünetmentes bőrből származó keratinocita őssejteket, rövid idejű *in vitro* tenyészetben, fokozott sejtnövekedésre készíti, hasonló hatást a normál bőrből származó sejteken nem láttunk.

Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy a pikkelysömörös keratinocita limfokinekre adott fokozott proliferatív válaszában milyen lehetséges mechanizmusok állhatnak. Mivel a sejtek proliferációját a szolubilis faktorok mellett leginkább a sejt extracelluláris mátrixából származó hatások befolyásolják és ismert, hogy a sebgyógyulás során aktiválódó és hiperproliferatív válnak keratinociták sejtkörnyezeti változásának a fibronectin megjelenése az egyik lényeges eleme, feltételeztük, majd igazoltuk, hogy a pikkelysömörös tünetmentes epidermiszben a normál epidermистől eltérően plazma fibronectin található a bazálisan elhelyezkedő keratinocita őssejtek környezetében. Azt is bizonyítottuk, hogy a pikkelysömörös tünetmentes epidermisz hámsejtjei a fibronectin receptorát ( $\alpha 5\beta 1$  integrin) fokozott mértékben fejezik ki a normál hámsejtekhez képest. Az  $\alpha 5$  integrin fokozott kifejeződését elősegítheti a plazma fibronectin jelenléte a pikkelysömörös bazális hámsejtek környezetében, ugyanakkor vizsgálataink szerint a hámsejtek onkofötális (EDA<sup>+</sup>) fibronectint is képesek termelni, ez szintén hozzájárulhat a fibronectin receptor fokozott kifejeződéséhez. Azt is bizonyítottuk, hogy aktivációs ingerre a tünetmentes epidermisz sejtjei a normál sejtekhez képest fokozottabb mértékben termelnek EDA<sup>+</sup> fibronectint.

Rekombináns humán limfokinek alkalmazásával igazoltuk, hogy a pikkelysömörös keratinocita őssejt normál sejtektől eltérő fokozott sejtciklus

indukciója IL-3-GM-CSF és  $\gamma$ IFN együttes hatására alakul ki. Az epidermális sejtek *ex vivo* rövid tenyészetében a limfokinek hatását a sejtkörnyezethez adott fibronectin felerősíti.

A tapadás-függő sejteken ismert, hogy a sejtproliferációt a fibronectin és receptorának kapcsolata a sejt adhéziójától függően pozitívan befolyásolja, vizsgálatainkból kiderült, hogy az  $\alpha 5$  integrinen keresztül érkező jel a hámsejtek sejtciklusát adhéziótól függetlenül is képes befolyásolni.

HaCaT keratinocitákon kimutattuk, hogy a sejtek proliferációjával szorosan összefügg az  $\alpha 5$  integrin és a keratin1/10 kifejeződése. Mind az  $\alpha 5$  integrin, mind a keratin 1 mRNS szinten szérumszintű faktorok szabályozása alatt áll, ugyanakkor a keratin 10 mRNS kifejeződését a szérumszintű faktorai nem befolyásolják.

Leírtuk, hogy az etanol és az acetonszintű koncentrációkban a HaCaT sejtekben a ciklin D1,  $\alpha 5$  integrin és a keratinocita növekedési faktor receptor (KGFR) mRNS szintű kifejeződését indukálja és a sejtek proliferációját fokozza.

Megállapítottuk, hogy a normál hámsejtekhez képest a pikkelysömörös lezió sejtjei differenciálódásuk és sejtciklusuk során eltérő IL-1 $\beta$  kifejeződést mutatnak. Igazoltuk, hogy a pikkelysömörös tünetes bőrt infiltráló T sejtek között  $\gamma$ INF-t termelő sejtek találhatók *in vivo*. Eredményeink szerint a pikkelysömörös tünetes betegek perifériás vérében a CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> NK T sejtek aránya szignifikánsan csökkent az egészséges kontrollokhoz képest. A különböző kezelések hatására a CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> NK T sejtek aránya megemelkedett a majdnem tünetmentessé váló betegekben, de a normál egyéneknél mért értékeknél ekkor is szignifikánsan alacsonyabb maradt, arra utalva, hogy a CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> NK T sejtek alacsony aránya a perifériás vérben nem a betegség aktivitására, hanem magára a betegségre jellemző.

Leírtuk, hogy az immunszuppresszív hatású rapamycin a T sejtek mellett a hámsejtek proliferációját is képes blokkolni és ezt a hatást a proliferálódó sejt nukleáris antigén (PCNA) *de novo* szintézisének gátlásával fejt ki.



## 8. A munka gyakorlati hasznosításának lehetősége

Vizsgálataink egy komplex bőrbetegség pathomechanizmusának jobb megértését célozták. A betegségek pathomechanizmusában szerepet játszó faktorok felderítése feltétele a hatékonyabb terápiás eljárások kidolgozásának.

Eredményeink hozzájárultak annak bizonyításához, hogy a pikkelysömörben a bőrt infiltráló aktivált T sejteknek fontos szerepe van. A közepes és súlyos fokú pikkelysömör gyógyításában már több olyan biológiai szert alkalmaznak sikerrel, melyeket az utóbbi években fejlesztettek ki és melyeknek célpontja a T sejt aktiváció gátlása.

Vizsgálatainkból az is kiderült, hogy a pikkelysömörös betegek makroszkóposan egészségesnek látszó bőréből származó hámsejtek az egészséges egyének bőréből származó hámsejtekhez képest eltérően, fokozott proliferációval reagálnak azokra a limfokinekre, melyeket a betegségben kialakuló gyulladás során a bőrt infiltráló aktivált T sejtek termelnek.

Eredményeink szerint a pikkelysömörös keratinocita össejt  $\gamma$ IFN-ra GM-CSF és IL-3 jelenlétében a normál sejtektől eltérő, kóros hiperproliferatív választ ad, melyet a fibronectin jelenléte felerősít. Az utóbbi évek vizsgálatai szerint a pikkelysömörös hámsejtekben a STAT-1 jelátviteli út sérült és folyamatos STAT-3 aktiváció észlelhető. A STAT-3 folyamatos aktiválása a hámsejtekben egér bőrében a pikkelysömörre emlékeztető elváltozást hoz létre. Ezen adatok alapján erősen felmerül annak a lehetősége, hogy a pikkelysömör pathomechanizmusának egyik alapvetően meghatározó eleme a STAT-1 aktivációs út inherens hibája. A korrekció lehetősége újabb terápiás célpont.

A tünetmentes pikkelysömörös és a normál hámszövet között mutatkozó eltérések megismerése olyan új terápiák kidolgozására teremtenek lehetőséget, melyekkel reményeink szerint a tünetek kialakulását is megelőzhetjük. A szöveti homeosztázis biztosításában az extracelluláris tér alkotóelemei alapvetően fontos szabályozó szerepet töltenek be. Bőrünk a folyamatosan megújuló szöveteink közé tartozik, melyben a hám bazálisan elhelyezkedő sejtjei össejt típusú sejtek, fiziológiás körülmények között nagy részük sejtnyugalmi állapotban van. A különböző környezeti hatások, például sebzés, következtében jellegzetesen

megváltozik a hám őssejtjeinek extracelluláris környezete, mely alapvetően hozzájárul a sejtek szöveti regenerációt eredményező proliferatív aktiválódásához.

Vizsgálataink bizonyították, hogy a pikkelysömörös betegek tünetmentes bőrében a keratinocita őssejtek az egészséges bőrtől eltérően folyamatosan fibronectin gazdag sejt környezetben vannak, ami részben szérumban, részben a keratinociták által termelt celluláris fibronectin, ennek lehet eredménye, hogy az  $\alpha 5$  integrint a sejtek erősen kifejezik, ami a proliferációs ingerekre fokozottabban érzékennyé teszi a sejteket. Kísérleteinkből az is kiderült, hogy az  $\alpha 5$  integrin a sejtek tapadásától függetlenül is képes a hámsejtek proliferációját befolyásolni.

A szérumban eredetű fibronectin jelenléte a hámsejtek környezetében arra utal, hogy a hám bazális barrierje a pikkelysömörös bőrben sérült. HaCaT sejteken végzett vizsgálataink bizonyították, hogy szérumban faktorok szabályozzák az  $\alpha 5$  integrin és a keratin 1 kifejeződést a hámsejtekben. A szérumban jelenléte az  $\alpha 5$  integrin kifejeződést serkenti, ugyanakkor a keratin1 kifejeződését gátolja. A fibronectinon kívül más szérumban faktorok is felelősek lehetnek ezért a szabályozásért, mindenesetre, úgy tűnik, hogy a tünetmentes pikkelysömörös bőrben a keratinocita őssejt típusú sejtek folyamatosan szérumban hatásoknak lehetnek kitéve, ami alapvetően befolyásolja proliferációs és differenciációs egyensúlyukat.

A fokozott alkoholfogyasztás pikkelysömört provokáló hatásának szerepét támogatják azok az eredményeink, melyekben bizonyítjuk, hogy bizonyos koncentrációban az etanol és az aceton HaCaT keratinocitákban a sejtproliferációt serkentő gének fokozott kifejeződését eredményezi és a sejtek proliferációját fokozza.

A makrolid immunszuppresszív hatású rapamycin keratinocitákra gyakorolt hatásának vizsgálatával megállapítottuk, hogy a szer az őssejt típusú keratinocita *de novo* PCNA szintézisét gátolja és a sejtek ciklusát a G1 fázisban blokkolja. Tekintettel arra, hogy a szer a T sejtek aktivációját is blokkolja, jó terápiás effektussal alkalmazható pikkelysömör kezelésében. A rapamycin keratinocitákra gyakorolt hatása annak lehetőségét is felveti, hogy a bőr hámeredetű tumoros megbetegedéseiben is használható lenne e viszonylag kevés mellékhatással rendelkező gyógyszer.

## **9. Az értekezés témájához kapcsolódó saját közlemények:**

Bata-Csörgő Zs, Hammerberg C, Voorhees JJ, Cooper KD: Flow cytometric identification of distinct proliferative populations within human epidermis: Keratinocyte hyperproliferation in psoriasis results from increased proliferation in the basal stem cell population.

J Exp Med, 178:1271-1281, 1993.

IF:13,687

Bata-Csörgő Zs, Hammerberg C, Voorhees JJ, Cooper KD: Kinetics and regulation of human keratinocyte stem cell growth in short term primary ex vivo culture; cooperative growth factors from psoriatic lesional T lymphocytes stimulate proliferation among psoriatic uninvolved but, not normal, stem keratinocytes.

J Clin Invest, 95:317-327, 1995.

IF: 8,788

Bata-Csörgő Zs, Hammerberg C, Voorhees JJ, Cooper KD: Intralesional T lymphocyte activation as a mediator of psoriatic epidermal hyperplasia.

J Invest Dermatol, 105:89S-94S, 1995.

IF: 3,681

## **10. A doktori értekezésben felhasznált eredményeket tartalmazó munkák:**

### **Külföldi kutatóhelyekről:**

Javier AF, Bata-Csörgő Zs, Ellis CN, Kang S, Voorhees JJ, Cooper KD: Rapamycin (sirolimus) inhibits proliferating cell nuclear antigen expression and blocks cell cycle in the G<sub>1</sub> phase in human keratinocyte stem cells.

J Clin Invest, 99:2094-2099, 1997.

IF: 9,667

Bata-Csörgő Zs, Cooper KD, Ting KM, Voorhees JJ, Hammerberg C: Fibronectin and  $\alpha 5$  integrin regulate keratinocyte cell cycling. A mechanism for increased fibronectin potentiation of T cell lymphokine-driven keratinocyte hyperproliferation in psoriasis.

J Clin Invest 101:1509-1518, 1998.

IF 9,315

Hammerberg C, Bata-Csörgő Zs, Voorhees JJ, Cooper KD: IL-1 and IL-1 receptor antagonist regulation during keratinocyte cell cycle and differentiation in normal and psoriatic epidermis.

Arch Dermatol Res, 290:367-374,1998.

IF: 1,421

Szabó SK, Hammerberg C, Yoshida Y, Bata-Csörgő Zs, Cooper KD: Identification and quantification of IFN $\gamma$  producing T cells in psoriatic lesions: localization to both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> subsets.

J Invest Dermatol, 111:1072-1078,1998.

IF 4,822

### **Hazai kutatóhelyekről:**

Első és utolsó szerzős publikációk:

Pivarcsi A, Széll M, Kemény L, Dobozy A, Bata-Csörgő Zs: Serum factors regulate the expression of the proliferation related genes  $\alpha$ 5 integrin and keratin 1 but not keratin 10 in HaCaT keratinocytes.

Arch Dermatol Res 293: 206-13, 2001.

IF: 1,425

Farkas Á, Kemény L, Széll M, Dobozy A, Bata-Csörgő Zs: Ethanol stimulates the proliferation of HaCaT cells.

Arch Dermatol Res 295: 56-62, 2003.

IF: 1,415

Széll M, Bata-Csörgő Zs, Koreck A, Pivarcsi A, Polyánka H, Szeg Cs, Gaál M, Dobozy A, Kemény L: Proliferating keratinocytes are putative sources of the psoriasis susceptibility related EDA<sup>+</sup> (extra domain A of fibronectin) oncofoetal fibronectin.

J Invest Dermatol 123:537-46, 2004.

IF: 4,194

Társszerzős publikáció:

Koreck A, Surányi A, Szőny BJ, Farkas Á, Bata-Csörgő Zs, Kemény L, Dobozy A:  
CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK T cells are significantly decreased in the peripheral blood of  
patients with psoriasis.

Clin Exp Immunol 127:176-82, 2002.

IF: 2,305

## 11. Irodalom

1. Ajchenbaum F, Ando K, DeCaprio JA and Griffin JD (1993) Independent regulation of human D-type cyclin gene expression during G1 phase in primary human T lymphocytes. *J Biol Chem* 268: 4113-4119.
2. Alexandrow MG, Kawabata M, Aakre M and Moses HL (1995) Overexpression of the c-Myc oncoprotein blocks the growth-inhibitory response but is required for the mitogenic effects of transforming growth factor beta 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3239-3243.
3. Allen MH, Veal C, Faassen A, Powis SH, Vaughan RW, Trembath RC and Barker JN (1999) A non-HLA gene within the MHC in psoriasis. *Lancet* 353: 1589-1590.
4. Asahina A, Kuwata S, Tokunaga K, Juji T, Nakagawa H (1996) Study of aspartate at residue 9 of HLA-C molecules in Japanese patients with psoriasis vulgaris *J Dermatol Sci* 13: 125-133
5. Asao H and Fu XY (2000) Interferon-gamma has dual potentials in inhibiting or promoting cell proliferation. *J Biol Chem* 275: 867-874.
6. Barker CL, McHale MT, Gillies AK, Waller J, Pearce DM, Osborne J, Hutchinson PE, Smith GM and Pringle JH (2004) The development and characterization of an in vitro model of psoriasis. *J Invest Dermatol* 123: 892-901.
7. Barton SP, Abdullah MS and Marks R (1992) Quantification of microvascular changes in the skin in patients with psoriasis. *Br J Dermatol* 126: 569-574.
8. Bata-Csorgo, Z., Cooper, K. D., Kang, B. K., Voorhees, J. J., and Hammerberg, C. Differential expression suggesting differential functions of D-type cyclins in normal human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 106, 828. 1996. Abstract
9. Bata-Csorgo Z, Cooper KD, Ting KM, Voorhees JJ and Hammerberg C (1998) Fibronectin and alpha5 integrin regulate keratinocyte cell cycling. A mechanism

- for increased fibronectin potentiation of T cell lymphokine-driven keratinocyte hyperproliferation in psoriasis. *J Clin Invest* 101: 1509-1518.
10. Bata-Csorgo Z, Hammerberg C, Voorhees JJ and Cooper KD (1993) Flow cytometric identification of proliferative subpopulations within normal human epidermis and the localization of the primary hyperproliferative population in psoriasis. *J Exp Med* 178: 1271-1281.
  11. Bata-Csorgo Z, Hammerberg C, Voorhees JJ and Cooper KD (1995) Kinetics and regulation of human keratinocyte stem cell growth in short-term primary ex vivo culture. Cooperative growth factors from psoriatic lesional T lymphocytes stimulate proliferation among psoriatic uninvolved, but not normal, stem keratinocytes. *J Clin Invest* 95: 317-327.
  12. Bill HM, Knudsen B, Moores SL, Muthuswamy SK, Rao VR, Brugge JS and Miranti CK (2004) Epidermal growth factor receptor-dependent regulation of integrin-mediated signaling and cell cycle entry in epithelial cells. *Mol Cell Biol* 24: 8586-8599.
  13. Bos JD, Hulsebosch HJ, Krieg SR, Bakker PM and Cormane RH (1983) Immunocompetent cells in psoriasis. In situ immunophenotyping by monoclonal antibodies. *Arch Dermatol Res* 275: 181-189.
  14. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A and Fusenig NE (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106: 761-771.
  15. Bravo R and Macdonald-Bravo H (1987) Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *J Cell Biol* 105: 1549-1554.
  16. Breitkreutz D, Schoop VM, Mirancea N, Baur M, Stark HJ and Fusenig NE (1998) Epidermal differentiation and basement membrane formation by HaCaT cells in surface transplants. *Eur J Cell Biol* 75: 273-286.

17. Carroll JM, Romero MR and Watt FM (1995) Suprabasal integrin expression in the epidermis of transgenic mice results in developmental defects and a phenotype resembling psoriasis. *Cell* 83: 957-968.
18. Celis JE and Celis A (1985) Cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: subdivision of S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 3262-3266.
19. Celis JE and Madsen P (1986) Increased nuclear cyclin/PCNA antigen staining of non S-phase transformed human amnion cells engaged in nucleotide excision DNA repair. *FEBS Lett* 209: 277-283.
20. Celis JE, Madsen P, Celis A, Nielsen HV and Gesser B (1987) Cyclin (PCNA, auxiliary protein of DNA polymerase delta) is a central component of the pathway(s) leading to DNA replication and cell division. *FEBS Lett* 220: 1-7.
21. Chin YE, Kitagawa M, Su WC, You ZH, Iwamoto Y and Fu XY (1996) Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science* 272: 719-722.
22. Coqueret O (2002) Linking cyclins to transcriptional control. *Gene* 299: 35-55.
23. Crespo JL and Hall MN (2002) Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 66: 579-91, table.
24. Datto MB, Li Y, Panus JF, Howe DJ, Xiong Y and Wang XF (1995) Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 5545-5549.
25. Delcommenne M and Streuli CH (1995) Control of integrin expression by extracellular matrix. *J Biol Chem* 270: 26794-26801.
26. Dimon-Gadal S, Raynaud F, Evain-Brion D and Keryer G (1998) MAP kinase abnormalities in hyperproliferative cultured fibroblasts from psoriatic skin. *J Invest Dermatol* 110: 872-879.



27. Dowdy SF, Hinds PW, Louie K, Reed SI, Arnold A and Weinberg RA (1993) Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell* 73: 499-511.
28. Dubin DB, Tanner W and Ellis R (2003) Biologics for psoriasis. *Nat Rev Drug Discov* 2: 855-856.
29. Easton JB and Houghton PJ (2004) Therapeutic potential of target of rapamycin inhibitors. *Expert Opin Ther Targets* 8: 551-564.
30. Eedy DJ, Burrows D, Bridges JM and Jones FG (1990) Clearance of severe psoriasis after allogenic bone marrow transplantation. *BMJ* 300: 908.
31. Elder JT, Nair RP, Henseler T, Jenisch S, Stuart P, Chia N, Christophers E and Voorhees JJ (2001) The genetics of psoriasis 2001: the odyssey continues. *Arch Dermatol* 137: 1447-1454.
32. Elder JT, Tavakkol A, Klein SB, Zeigler ME, Wicha M and Voorhees JJ (1990) Protooncogene expression in normal and psoriatic skin. *J Invest Dermatol* 94: 19-25.
33. Ellis CN, Gorsulowsky DC, Hamilton TA, Billings JK, Brown MD, Headington JT, Cooper KD, Baadsgaard O, Duell EA, Annesley TM and . (1986) Cyclosporine improves psoriasis in a double-blind study. *JAMA* 256: 3110-3116.
34. Falcone M, Yeung B, Tucker L, Rodriguez E and Sarvetnick N (1999) A defect in interleukin 12-induced activation and interferon gamma secretion of peripheral natural killer T cells in nonobese diabetic mice suggests new pathogenic mechanisms for insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med* 190: 963-972.
35. Fleischmajer R, Kuroda K, Hazan R, Gordon RE, Lebwohl MG, Sapadin AN, Unda F, Iehara N and Yamada Y (2000) Basement membrane alterations in psoriasis are accompanied by epidermal overexpression of MMP-2 and its inhibitor TIMP-2. *J Invest Dermatol* 115: 771-777.

36. Fransson J, Shen Q, Scheynius A and Hammar H (1996) The effect of IFN-gamma on healthy and psoriatic keratinocytes in a skin equivalent model is influenced by the source of the keratinocytes and by their interactions with fibroblasts. *Arch Dermatol Res* 289: 14-20.
37. Gandarillas A and Watt FM (1997) c-Myc promotes differentiation of human epidermal stem cells. *Genes Dev* 11: 2869-2882.
38. Gardembas-Pain M, Ifrah N, Foussard C, Boasson M, Saint AJ and Verret JL (1990) Psoriasis after allogeneic bone marrow transplantation. *Arch Dermatol* 126: 1523.
39. Ghoreschi K, Mrowietz U and Rocken M (2003) A molecule solves psoriasis? Systemic therapies for psoriasis inducing interleukin 4 and Th2 responses. *J Mol Med* 81: 471-480.
40. Gupta MA, Schork NJ, Gupta AK and Ellis CN (1993) Alcohol intake and treatment responsiveness of psoriasis: a prospective study. *J Am Acad Dermatol* 28: 730-732.
41. Hashiro M, Matsumoto K, Okumura H, Hashimoto K and Yoshikawa K (1991) Growth inhibition of human keratinocytes by antisense c-myc oligomer is not coupled to induction of differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 174: 287-292.
42. Henseler T and Christophers E (1995) Disease concomitance in psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 32: 982-986.
43. Hern S, Stanton AW, Mellor RH, Harland CC, Levick JR and Mortimer PS (2005) Blood flow in psoriatic plaques before and after selective treatment of the superficial capillaries. *Br J Dermatol* 152: 60-65.
44. Higgins EM and du Vivier AW (1994) Alcohol abuse and treatment resistance in skin disease. *J Am Acad Dermatol* 30: 1048.

45. Huang S, Varani J and Chakrabarty S (1994) Control of AKR fibroblast phenotype by fibronectin: regulation of cell- surface fibronectin binding receptor by fibronectin. *J Cell Physiol* 161: 470-482.
46. Inoue T, Nabeshima K, Shimao Y, Meng JY and Koono M (2001) Regulation of fibronectin expression and splicing in migrating epithelial cells: migrating MDCK cells produce a lesser amount of, but more active, fibronectin. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 1262-1268.
47. Jackson M, Howie SE, Weller R, Sabin E, Hunter JA and McKenzie RC (1999) Psoriatic keratinocytes show reduced IRF-1 and STAT-1 $\alpha$  activation in response to gamma-IFN. *FASEB J* 13: 495-502.
48. Jaskulski D, deRiel JK, Mercer WE, Calabretta B and Baserga R (1988) Inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxynucleotides to PCNA cyclin. *Science* 240: 1544-1546.
49. Javier AF, Bata-Csorgo Z, Ellis CN, Kang S, Voorhees JJ and Cooper KD (1997) Rapamycin (sirolimus) inhibits proliferating cell nuclear antigen expression and blocks cell cycle in the G1 phase in human keratinocyte stem cells. *J Clin Invest* 99: 2094-2099.
50. Kanamori H, Tanaka M, Kawaguchi H, Yamaji S, Fujimaki K, Tomita N, Fujisawa S and Ishigatsubo Y (2002) Resolution of psoriasis following allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia: case report and review of the literature. *Am J Hematol* 71: 41-44.
51. Kemeny L, Csato M, Nyiradi J, Gabor M and Dobozy A (1988) Decreased capillary resistance of the uninvolved skin in psoriasis. *Acta Derm Venereol* 68: 459-460.
52. Kemeny L, Kenderessy AS, Olasz E, Michel G, Ruzicka T, Farkas B and Dobozy A (1994) The interleukin-8 receptor: a potential target for antipsoriatic therapy? *Eur J Pharmacol* 258: 269-272.

53. Kim LT, Ishihara S, Lee CC, Akiyama SK, Yamada KM and Grinnell F (1992) Altered glycosylation and cell surface expression of beta 1 integrin receptors during keratinocyte activation. *J Cell Sci* 103: 743-753.
54. Koreck A, Suranyi A, Szony BJ, Farkas A, Bata-Csorgo Z, Kemeny L and Dobozy A (2002) CD3+CD56+ NK T cells are significantly decreased in the peripheral blood of patients with psoriasis. *Clin Exp Immunol* 127: 176-182.
55. Krueger GG and Jorgensen CM (1990) Experimental models for psoriasis. *J Invest Dermatol* 95: 56S-58S.
56. Larouche K, Leclerc S, Salesse C and Guerin SL (2000) Expression of the alpha 5 integrin subunit gene promoter is positively regulated by the extracellular matrix component fibronectin through the transcription factor Sp1 in corneal epithelial cells in vitro. *J Biol Chem* 275: 39182-39192.
57. Lavker RM and Sun TT (1982) Heterogeneity in epidermal basal keratinocytes: morphological and functional correlations. *Science* 215: 1239-1241.
58. Leblond, C. P., Greulich, R. C., and Marques-Pereira, J. P. (1964) Relationship of cell formation and cell migration in the renewal of stratified squamous epithelia. *Adv Biol Skin* 5: 39-67.
59. Lee HH, Chiang WH, Chiang SH, Liu YC, Hwang J and Ng SY (1995) Regulation of cyclin D1, DNA topoisomerase I, and proliferating cell nuclear antigen promoters during the cell cycle. *Gene Expr* 4: 95-109.
60. Leong PL, Andrews GA, Johnson DE, Dyer KF, Xi S, Mai JC, Robbins PD, Gadiparthi S, Burke NA, Watkins SF and Grandis JR (2003) Targeted inhibition of Stat3 with a decoy oligonucleotide abrogates head and neck cancer cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4138-4143.
61. Li J, Tripathi BJ and Tripathi RC (2000) Modulation of pre-mRNA splicing and protein production of fibronectin by TGF-beta2 in porcine trabecular cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 3437-3443.

62. Liu YC, Marraccino RL, Keng PC, Bambara RA, Lord EM, Chou WG and Zain SB (1989) Requirement for proliferating cell nuclear antigen expression during stages of the Chinese hamster ovary cell cycle. *Biochemistry* 28: 2967-2974.
63. Lortat-Jacob H and Grimaud JA (1991) Interferon-gamma C-terminal function: new working hypothesis. Heparan sulfate and heparin, new targets for IFN-gamma, protect, relax the cytokine and regulate its activity. *Cell Mol Biol* 37: 253-260.
64. Lortat-Jacob H and Grimaud JA (1992) Binding of interferon-gamma to heparan sulfate is restricted to the heparin-like domains and involves carboxylic--but not N-sulfated--groups. *Biochim Biophys Acta* 1117: 126-130.
65. Lortat-Jacob H, Kleinman HK and Grimaud JA (1991) High-affinity binding of interferon-gamma to a basement membrane complex (matrigel). *J Clin Invest* 87: 878-883.
66. Masuda M, Suzui M, Yasumatu R, Nakashima T, Kuratomi Y, Azuma K, Tomita K, Komiyama S and Weinstein IB (2002) Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription 3 correlates with cyclin D1 overexpression and may provide a novel prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 62: 3351-3355.
67. Mieza MA, Itoh T, Cui JQ, Makino Y, Kawano T, Tsuchida K, Koike T, Shirai T, Yagita H, Matsuzawa A, Koseki H and Taniguchi M (1996) Selective reduction of V alpha 14+ NK T cells associated with disease development in autoimmune-prone mice. *J Immunol* 156: 4035-4040.
68. Mondello MR, Magaudda L, Pergolizzi S, Santoro A, Vaccaro M, Califano L, Cannavo SP and Guarneri B (1996) Behaviour of laminin 1 and type IV collagen in uninvolved psoriatic skin. Immunohistochemical study using confocal laser scanning microscopy. *Arch Dermatol Res* 288: 527-531.
69. Monk BE and Neill SM (1986) Alcohol consumption and psoriasis. *Dermatologica* 173: 57-60.

70. Paramio JM, Casanova ML, Segrelles C, Mittnacht S, Lane EB and Jorcano JL (1999) Modulation of cell proliferation by cytokeratins K10 and K16. *Mol Cell Biol* 19: 3086-3094.
71. Pellegrini G, De Luca M, Orecchia G, Balzac F, Cremona O, Savoia P, Cancedda R and Marchisio PC (1992) Expression, topography, and function of integrin receptors are severely altered in keratinocytes from involved and uninvolved psoriatic skin. *J Clin Invest* 89: 1783-1795.
72. Picker LJ, Singh MK, Zdraveski Z, Treer JR, Waldrop SL, Bergstresser PR and Maino VC (1995) Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry. *Blood* 86: 1408-1419.
73. Pietenpol JA, Holt JT, Stein RW and Moses HL (1990) Transforming growth factor beta 1 suppression of c-myc gene transcription: role in inhibition of keratinocyte proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 3758-3762.
74. Pines J (1995) Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations. *Adv Cancer Res* 66:181-212.: 181-212.
75. Pinkus H and Mehregan AH (1966) The primary histologic lesion of seborrheic dermatitis and psoriasis. *J Invest Dermatol* 46: 109-116.
76. Pivarcsi A, Koreck A, Bodai L, Szell M, Szeg C, Belso N, Kenderessy-Szabo A, Bata-Csorgo Z, Dobozy A and Kemeny L (2004) Differentiation-regulated expression of Toll-like receptors 2 and 4 in HaCaT keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 296: 120-124.
77. Prinz JC (1999) Which T cells cause psoriasis? *Clin Exp Dermatol* 24: 291-295.
78. Quintanilla-Martinez L, Kremer M, Specht K, Calzada-Wack J, Nathrath M, Schaich R, Hofler H and Fend F (2003) Analysis of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat 3) pathway in multiple myeloma: Stat 3 activation and cyclin D1 dysregulation are mutually exclusive events. *Am J Pathol* 162: 1449-1461.

79. Rao A, Luo C and Hogan PG (1997) Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15:707-47.: 707-747.
80. Reichelt J and Magin TM (2002) Hyperproliferation, induction of c-Myc and 14-3-3sigma, but no cell fragility in keratin-10-null mice. *J Cell Sci* 115: 2639-2650.
81. Reitamo S, Spuls P, Sassolas B, Lahfa M, Claudy A and Griffiths CE (2001) Efficacy of sirolimus (rapamycin) administered concomitantly with a subtherapeutic dose of cyclosporin in the treatment of severe psoriasis: a randomized controlled trial. *Br J Dermatol* 145: 438-445.
82. Reynisdottir I, Polyak K, Iavarone A and Massague J (1995) Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev* 9: 1831-1845.
83. Roberts R, Gallagher J, Spooncer E, Allen TD, Bloomfield F and Dexter TM (1988) Heparan sulphate bound growth factors: a mechanism for stromal cell mediated haemopoiesis. *Nature* 332: 376-378.
84. Rothaupt, D. B., McCormick, S. A., Stevens, S. R., and Cooper, K. D. (2000) EDA-Fibronectin is Co-Localized with CD11c+ Cells at the Dermal-Epidermal Junction in Psoriatic Tissue. *J Invest Dermatol* 114: 864. Abstract
85. Ryle CM, Breitkreutz D, Stark HJ, Leigh IM, Steinert PM, Roop D and Fusenig NE (1989) Density-dependent modulation of synthesis of keratins 1 and 10 in the human keratinocyte line HACAT and in ras-transfected tumorigenic clones. *Differentiation* 40: 42-54.
86. Saito S, Yamaji N, Yasunaga K, Saito T, Matsumoto S, Katoh M, Kobayashi S and Masuho Y (1999) The fibronectin extra domain A activates matrix metalloproteinase gene expression by an interleukin-1-dependent mechanism. *J Biol Chem* 274: 30756-30763.
87. Sano S, Chan KS, Carbajal S, Clifford J, Peavey M, Kiguchi K, Itami S, Nickoloff BJ and Digiovanni J (2005) Stat3 links activated keratinocytes and

- immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat Med* 11: 43-49.
88. Schmid P, Cox D, McMaster GK and Itin P (1993) In situ hybridization analysis of cytokine, proto-oncogene and tumour suppressor gene expression in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 285: 334-340.
  89. Schoop VM, Mirancea N and Fusenig NE (1999) Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 112: 343-353.
  90. Sherr CJ (1993) Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73: 1059-1065.
  91. Snowden JA and Heaton DC (1997) Development of psoriasis after syngeneic bone marrow transplant from psoriatic donor: further evidence for adoptive autoimmunity. *Br J Dermatol* 137: 130-132.
  92. Steude J, Kulke R and Christophers E (2002) Interleukin-1-stimulated secretion of interleukin-8 and growth-related oncogene-alpha demonstrates greatly enhanced keratinocyte growth in human raft cultured epidermis. *J Invest Dermatol* 119: 1254-1260.
  93. Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, Garaczi E, Shimada S, Stevens SR, McCormick TS and Cooper KD (2005) Dysfunctional blood and target tissue CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol* 174: 164-173.
  94. Szabo SK, Hammerberg C, Yoshida Y, Bata-Csorgo Z and Cooper KD (1998) Identification and quantitation of interferon-gamma producing T cells in psoriatic lesions: localization to both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> subsets. *J Invest Dermatol* 111: 1072-1078.



95. Szell M, Bata-Csorgo Z, Koreck A, Pivarcsi A, Polyanka H, Szeg C, Gaal M, Dobozy A and Kemeny L (2004) Proliferating Keratinocytes Are Putative Sources of the Psoriasis Susceptibility-Related EDA(Extra Domain A of Fibronectin) Oncofetal Fibronectin. *J Invest Dermatol* 123: 537-546.
96. Szolnok G, Bata-Csorgo Z, Kenderessy AS, Kiss M, Pivarcsi A, Novak Z, Nagy NK, Michel G, Ruzicka T, Marodi L, Dobozy A and Kemeny L (2001) A mannose-binding receptor is expressed on human keratinocytes and mediates killing of *Candida albicans*. *J Invest Dermatol* 117: 205-213.
97. Ting KM, Rothaupt D, McCormick TS, Hammerberg C, Chen G, Gilliam AC, Stevens S, Culp L and Cooper KD (2000) Overexpression of the oncofetal Fn variant containing the EDA splice-in segment in the dermal-epidermal junction of psoriatic uninvolved skin. *J Invest Dermatol* 114: 706-711.
98. Vaccaro M, Magaudda L, Cutroneo G, Trimarchi F, Barbuzza O, Guarneri F and Guarneri B (2002) Changes in the distribution of laminin alpha1 chain in psoriatic skin: immunohistochemical study using confocal laser scanning microscopy. *Br J Dermatol* 146: 392-398.
99. Valdimarsson H, Baker BS, Jonsdottir I and Fry L (1986) Psoriasis: a disease of abnormal keratinocyte proliferation induced by T lymphocytes. *Immunol Today* 7: 257-259.
100. Vincenti GE and Blunden SM (1987) Psoriasis and alcohol abuse. *J R Army Med Corps* 133: 77-78.
101. Watt FM and Hertle MD (1994) Keratinocyte integrins. In: Leigh I, Lane B and Watt F (eds) *The Keratinocyte Handbook*, pp 153-164. Cambridge University Press, Cambridge.
102. Werner S, Beer HD, Mauch C, Luscher B and Werner S (2001) The Mad1 transcription factor is a novel target of activin and TGF-beta action in keratinocytes: possible role of Mad1 in wound repair and psoriasis. *Oncogene* 20: 7494-7504.

103. Yaar M, Gilani A, DiBenedetto PJ, Harkness DD and Gilchrest BA (1993) Gene modulation accompanying differentiation of normal versus malignant keratinocytes. *Exp Cell Res* 206: 235-243.
104. Younus J and Gilchrest BA (1992) Modulation of mRNA levels during human keratinocyte differentiation. *J Cell Physiol* 152: 232-239.
105. Zhou Y and Chaplin DD (1993) Identification in the HLA class I region of a gene expressed late in keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 9470-9474.

## 12. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel és hálával tartozom minden idősebb és fiatalabb kollegámnak, akikkel az évek során együtt dolgoztam. Különösen hálás vagyok azért, mert az együtt végzett munka minden kollegámmal mindig örömteli, vidám hangulatban folyt.

Prof. Dr. Simon Miklós indított el pályámon, tőle tanultam a bőrgyógyászatot és azt, hogyan kell orvosként működni. Prof. Dr. Dobozy Attilának köszönhetem az allergológia, klinikai immunológia és a kutatás iránti érdeklődésem felkeltését. Prof. John J. Voorhees támogatása, Prof. Kevin D. Cooper és Craig Hammerberg tanítása és mindennapos segítsége kutatómunkám végzése során alapvetően meghatározó volt. Prof. Dr. Kemény Lajos nemcsak a kutatómunkában, de a napi klinikusi tevékenységben is folyamatosan segítségemre van. Dr. Kenderessy Szabó Anna töretlen jókedvvel tanított a laboratóriumi munka alapvető ismereteire, a pikkelysömörrel kapcsolatos kutatómunka során utóbb Dr. Széll Márta van nagy segítségemre. Fiatalabb kollegáimnak, Annabelle Javier, dr. Pivarsci Andor, dr. Farkas Árpád, dr. Szabó Sarolta, dr. Koreck Andrea, dr. Szolnoki Győző, dr. Szöny Barnabás, dr. Szabad Gábor, dr. Belső Nóra, Kormos Bernadett, hálás vagyok a közös munka eredményességéért és az együtt töltött kellemes időért.

Köszönöm Gyimesi Andreának és Nagy Annamáriának a klinikán együtt töltött estéket és hétvégeket, melyek nélkül nem születnének meg dolgozataink és pályázataink.

Családom megértő támogatása, segítsége alapvetően meghatározta munkámat.

Köszönettel tartozom az Amerikai Dermatológiai Alapítványnak, mert három éven keresztül anyagi támogatást nyújtva lehetővé tette számomra a kutatómunka végzését. A Magyar Oktatási Minisztérium 2001-2002-ben a Békésy György ösztöndíjjal támogatott. 2003-tól a Széchenyi István ösztöndíjjal támogat.

A disszertációban ismertetett kísérletes munka anyagi bázisát a következő támogatások biztosították: Amerikai Dermatológiai Alapítvány kutatási pályázat, 1995-96, NIH RO1, USA, 1995-98, Országos Tudományos Kutatási Alap (OTKA) T 023388 1997-2000, T 032496 2000-03, TS 044826 2003-2005.